

CAROLINE GRASSI MELLINGER

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE CARBOIDRATOS DE *Phyllanthus niruri*
(QUEBRA-PEDRA)**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

Co-Orientador: Prof. Dr. Philip A. J. Gorin

CURITIBA
2006

Com muito amor:

Ao meu marido Fabien,
Aos meus filhos Thyago, Giovanna e Felipe,
Ao meu pai Diclei,
À minha mãe Sheila (*in memoriam*)

Vocês são maravilhosos, obrigado por serem
parte da minha vida!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que possibilita todas as coisas e capacita todas as pessoas, por permitir e abençoar a minha caminhada, por todo seu amor e fidelidade incondicionais;

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Marcello Iacomini, com quem compartilhei momentos maravilhosos, de grande crescimento pessoal e profissional. Obrigado pelo apoio, confiança e paciência;

Ao meu também querido co-orientador, Prof. Dr. Philip Gorin, pelo apoio e auxílio sempre presentes. Obrigado pela disposição;

À Dra. Guilhermina R. Noleto, por todo o auxílio na realização dos experimentos biológicos, pela disposição em ensinar e pela nova amizade que surgiu com o nosso convívio;

À Profa. Dra. Maria Benigna M. Oliveira, por aceitar e supervisionar a colaboração na realização dos experimentos biológicos;

À coordenação do curso de Pós-Graduação em Bioquímica, em nome da Profa. Dra. Leda Schubatzu, pela dedicação ao curso;

À chefe do Departamento de Bioquímica, Profa. Dra. Maria Benigna M. Oliveira;

Aos professores do Departamento de Bioquímica, que com afinho dedicam-se à arte de ensinar;

À Profa. Dra. Glaci Zancan, pelo exemplo de pessoa e profissional a ser seguido;

À Ms. Nathieli Takemori e à Profa. Dra. Cleusa Bona, do Departamento de Botânica da UFPR, pela confirmação taxonômica de *Phyllanthus niruri*;

Ao Dr. Giangiacomo Torri e ao Instituto Ronzoni, Milão, Itália, pelas análises espectroscópicas;

Aos Profs. Drs. Guilherme Sasaki e Miguel Nosedá pelas análises espectroscópicas;

Ao Dr. Alfreli Arruda do Amaral, por realizar as endoscopias e coleta do suco gástrico;

À Andréia de Carvalho e Rosane pelas análises em GC-MS, GLC e HPSEC-MALLS;

À todos os funcionários do Departamento de Bioquímica, em especial à D. Marilza Lamour e Nanci Albuquerque pela atenção e auxílio dispensados;

Às bibliotecárias Mariza Kampfert, Ruth dos Santos, Izabela Fernandes e Thelma Assis, pela colaboração e disposição em ajudar;

Ao CNPq, Pronex-Carboidratos e Fundação Araucária pelo auxílio financeiro;

À Indústria Farmacêutica “As Ervas Curam” pelo material cedido neste trabalho;

Ao aluno de iniciação científica e amigo Breno Maurício Marson, por todo o auxílio nos experimentos e pela grata oportunidade de acompanhar o seu crescimento científico;

Às alunas de iniciação científica e amigas Maria Luisa Bertolini e Fhernanda Smiderli, pela agradável convivência e por permitirem que eu faça parte das suas iniciações na ciência;

À Elaine Carbonero, com muito carinho, por você ser uma grande amiga e ter me ensinado e ajudado muito ao longo destes anos;

Às amigas do peito Paula Tischer, Ana Helena Gracher e Fernanda Simas por vocês serem o máximo e estarem tão presentes nesta caminhada;

Às minhas grandes amigas Rosiane Zibetti, Andréia Ruthes, Lucimara Cordeiro, Juliana Cury, e Mariana Piemonte por todo o apoio e carinho;

Aos meus amigos Thales Cipriani e Ricardo Wagner, pela amizade sincera, troca de idéias e todos os momentos agradáveis;

Ao pessoal dos laboratórios 252, 247, anexo: Rodrigo Reis, Gracielle Viccini, Dirce Leimi, Guilherme Sasaki, Lauro Souza, , Rodrigo Vassoler, , João Marcus e Felipe Czelusniak, pela convivência e colaboração;

Ao pessoal dos laboratórios vizinhos: Juliana Cassolato, Adriano Vieira, Alan Gonçalves, Sérgio Ascêncio, Marco Cardoso, Diogo e Luciana, pela convivência;

Com muito amor ao meu marido Fabien Silva que ultrapassou os limites da paciência, foi compreensivo na minha ausência e presente em todos os momentos da realização deste trabalho;

Aos meus abençoados filhos Thyago, Giovanna e Felipe Mellinger Silva, por encherem minha vida de amor e alegria. AMO MUITO VOCÊS;

Com muito amor ao meu pai Diclei Mellinger, por ser sempre incansável em me ajudar e ser tão presente em toda a minha vida;

Com muitas saudades à minha mãe Sheila, que apesar de não estar mais comigo, deixou seu exemplo de força e coragem, sempre acreditando no meu potencial;

À minha irmã Giselle Massi pelo estímulo e lições de coragem, e ao meu irmão Jefferson Mellinger pela força e exemplo de vitória;

Aos meus sogros Odacir e Neusa Pereira da Silva, por me apoiarem com muito carinho e serem tão prestativos nos momentos difíceis. Muito obrigado de todo coração;

Em extensão, à grande família Pereira da Silva, por me receberem com tanto carinho e serem indispensáveis na minha vida;

À Roni Fernandes, por ter dedicado o seu trabalho em prol dos meus filhos.

“Confia no Senhor de todo o teu coração e não te estribes no teu próprio entendimento. Reconhece-o em todos os teus caminhos, e ele endireitará as tuas veredas”.

Provérbios 3: 5,6

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiii
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 INTRODUÇÃO AOS POLISSACARÍDEOS DE VEGETAIS SUPERIORES	3
2.2 PAREDE CELULAR VEGETAL.....	3
2.3 HEMICELULOSES.....	6
2.3.1 Xilanas.....	7
2.4 PECTINAS.....	9
2.5 ARABINO GALACTANAS.....	12
2.5.1 Arabinogalactanas do Tipo I.....	13
2.5.2 Arabinogalactanas do Tipo II.....	15
2.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS.....	16
2.6.1 Atividades Biológicas de Arabinogalactanas.....	19
2.7 MACRÓFAGOS.....	20
2.7.1 “BURST” RESPIRATÓRIO.....	24
2.7.2 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO.....	25
2.8 OS POLISSACARÍDEOS E AS FIBRAS.....	27
2.8.1 Digestão de Polissacarídeos.....	28
2.9 A PLANTA <i>Phyllanthus niruri</i> Linné.....	30
3 OBJETIVOS.....	34
3.1 OBJETIVO GERAL.....	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 OBTENÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DO VEGETAL.....	35

4.2 EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS.....	35
4.2.1 Deslipidificação.....	35
4.2.2 Extrações Aquosas.....	36
4.2.2.1 Infusão.....	36
4.2.2.2 Decocção.....	36
4.2.2.3 Extração aquosa exaustiva.....	37
4.2.2.4 Extração aquosa dos órgãos vegetais.....	37
4.2.3 Extrações Alcalinas.....	38
4.2.3.1 Extrações alcalinas da planta inteira.....	38
4.2.3.2 Extrações alcalinas dos órgãos vegetais.....	38
4.3 PURIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS.....	39
4.3.1 Congelamento e Degelo.....	39
4.3.2 Precipitação com Solução de Fehling.....	39
4.3.3 Diálise em Membranas.....	40
4.3.4 Ultrafiltração.....	40
4.4 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS.....	41
4.4.1 Métodos Químicos.....	41
4.4.1.1 Hidrólise ácida total, redução e acetilação.....	41
4.4.1.2 Análise de Metilação.....	42
4.4.1.3 Metanólise.....	42
4.4.1.4 Hidrólise para formar os derivados parcialmente <i>O</i> -metilados.....	42
4.4.1.5 Carboxi-redução dos polissacarídeos ácidos.....	43
4.4.2 Métodos Espectrofotométricos.....	43
4.4.2.1 Dosagem de açúcar total.....	43
4.4.2.2 Dosagem de ácidos urônicos.....	44
4.4.2.3 Dosagem de proteínas.....	44
4.4.3 Métodos Cromatográficos.....	45
4.4.3.1 Cromatografia de partição em papel (PC).....	45
4.4.3.2 Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS).....	45

4.4.3.3 Cromatografia de exclusão estérica acoplada a multidetectores (HPSEC-MALLS).....	46
4.4.4 Análises Espectroscópicas.....	46
4.5 EXPERIMENTOS BIOLÓGICOS.....	47
4.5.1 Animais.....	47
4.5.2 Obtenção de Macrófagos Peritoneais.....	47
4.5.3 Meios Utilizados nos Experimentos com Macrófagos.....	48
4.5.3.1 Solução salina tamponada.....	48
4.5.3.2 Solução salina balanceada de Hanks (HBSS).....	48
4.5.3.3 Meio mínimo essencial (MEM).....	49
4.5.4 Experimentos <i>in vitro</i> com Macrófagos Peritoneais de Camundongos.....	49
4.5.4.1 Determinação da viabilidade celular.....	49
4.5.4.2 Determinação da produção de ânion superóxido.....	50
4.5.4.3 Determinação da produção de óxido nítrico.....	50
4.5.5 Avaliação da Atividade Elicitora <i>in vivo</i> de Células.....	51
4.5.6 Análises Estatísticas.....	51
4.7 COMPORTAMENTO POLISSACARÍDICO EM CONDIÇÃO FISIOLÓGICA GÁSTRICA.....	51
4.7.1 Voluntários.....	51
4.7.2.1 Endoscopia.....	52
4.7.2.2 Coleta e armazenamento do suco gástrico.....	52
4.7.3 Análise Estrutural <i>in vitro</i> de Carboidratos em Condição Fisiológica Gástrica.....	52
4.7.3.1 Hidrólise ácida de polissacarídeos em condição fisiológica gástrica.....	52
4.7.3.2 Fracionamento dos produtos da hidrólise ácida.....	53
4.7.3.3 Análises espectrométricas e espectroscópicas.....	53
4.7.3.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (hplc).....	53
4.7.3.5 Experimentos biológicos.....	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.1 ANÁLISES QUÍMICAS DE POLISSACARÍDEOS.....	55

5.1.1 Extrações Aquosas.....	56
5.1.1.1 Extrações aquosas populares.....	56
5.1.1.2 Extração aquosa exaustiva.....	64
5.1.2 Extrações Alcalinas.....	72
5.1.3 Extrações dos Órgãos Vegetais.....	81
5.1.3.1 Extrações aquosas dos órgãos vegetais.....	81
5.1.3.2 Extrações alcalinas dos órgãos vegetais.....	86
5.1.3.2.1 Extrações alcalinas com KOH 2% dos órgãos vegetais.....	86
5.1.3.2.2 Extrações alcalinas com NaOH 15% dos órgãos vegetais.....	90
5.2 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE POLISSACARÍDEO.....	94
5.3 COMPORTAMENTO POLISSACARÍDICO EM CONDIÇÃO FISIOLÓGICA GÁSTRICA.....	101
6 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	115
7 CONCLUSÕES.....	117
REFERÊNCIAS.....	119
ANEXOS.....	140

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - Organização da parede celular em vegetais superiores.....	5
FIGURA 02 - Principais cadeias laterais substituintes do esqueleto β -(1 \rightarrow 4) xilopiranosil.....	8
FIGURA 03 - Modelo estrutural de uma ramnogalacturonana do tipo I.....	11
FIGURA 04 - Modelo esquemático da estrutura da parede celular primária de vegetais, proposto por ALBERSHEIM (1975).....	13
FIGURA 05 - Estrutura das arabinogalactanas do tipo I.....	14
FIGURA 06 - Exemplo estrutural de uma arabinogalactana do tipo II.....	16
FIGURA 07 - Papel central dos macrófagos no sistema imunológico.....	21
FIGURA 08 - Diferentes formas de ativação de macrófagos induzidos por polissacarídeos vegetais.....	22
FIGURA 09 - Reação de formação do óxido nítrico a partir da L-arginina.....	26
FIGURA 10 - Visão geral do sistema digestivo.....	30
FIGURA 11 - Fotos de (A) Ramo de <i>Phyllanthus niruri</i> , (B) <i>P. niruri</i> – planta inteira....	31
FIGURA 12 - Exemplos de metabólitos secundários isolados de plantas do gênero <i>Phyllanthus</i> . (A) quercetina-3- <i>O</i> - β -D-glucosídeo, (B) canferol-3- <i>O</i> - β -D-glucosídeo, (C) geraniína e (D) nirurisida.....	32
FIGURA 13 - Fluxograma das extrações aquosas e alcalinas realizadas com <i>P. niruri</i>	55
FIGURA 14 - Fluxograma dos processos de obtenção do (A) decocto e (B) infuso.....	56
FIGURA 15 - Precipitação etanólica do infuso de <i>P. niruri</i>	57
FIGURA 16 - Fluxograma de purificação de polissacarídeos do infuso (INF-E10) e decocto (DEC-E10) de <i>P. niruri</i>	59
FIGURA 17 - Perfil de eluição de (A) DEC-E10 e (B) INF-E10 em HPSEC, detectado pelo índice de refração. (C) Determinação da massa cumulativa em relação à massa molar de INF-E10.....	61
FIGURA 18 - Espectros de ^{13}C -RMN de (A) INF-E10 e (B) DEC-E10.....	62
FIGURA 19 - Fluxograma do processo de extração aquosa exaustiva de <i>P. niruri</i>	64
FIGURA 20 - Análise do perfil cromatográfico em cromatografia em papel dos extratos aquosos obtidos, seqüencialmente, a 100°C.....	65
FIGURA 21 - Perfil de eluição de AG-E10 em HPSEC, detectado pelo índice de refração.....	67
FIGURA 22 - Espectros de ^{13}C -RMN de (A) INF-E10, (B) DEC-E10 e (C) AG-E10.....	68
FIGURA 23 - Espectros de DEPT de AG-E10.....	69
FIGURA 24 - Fluxograma de extração e purificação dos polissacarídeos de <i>P. niruri</i> , obtidos após tratamento alcalino (KOH 2%).....	73
FIGURA 25 - Perfis de eluição de (A) 2R16 e (B) 2E30 analisadas em HPSEC.....	74
FIGURA 26 - Perfis de eluição de (A) 2SFEH e (B) 2PFEH analisadas em HPSEC.....	76
FIGURA 27 - Espectro de ^{13}C -RMN de 2PFEH, obtido com extração alcalina a 2%.....	77
FIGURA 28 - Perfis de eluição das amostras (A) 2PFEH nativa e (B) carboxi-reduzida em GC-MS.....	78
FIGURA 29 - Fluxograma do processo de extração aquosa e fracionamento de polissacarídeos dos órgãos vegetais de <i>P. niruri</i>	82
FIGURA 30 - Perfis de eluição de (A) FS, (B) CS e (C) RS analisadas em HPSEC.....	84

FIGURA 31 - Espectros de ^{13}C -RMN de (A) FS, (B) CS e (C) RS, obtidos a partir do extrato aquoso de folhas, caules e raízes, respectivamente.....	85
FIGURA 32 - Fluxograma do processo de extração alcalina com KOH 2% e semi-purificação de polissacarídeos dos órgãos vegetais de <i>P. niruri</i>	86
FIGURA 33 - Perfis de eluição de (A) 2FS, (B) 2CS e (C) 2RS analisadas em HPSEC...	88
FIGURA 34 - Espectros de ^{13}C -RMN de (A) 2FS, (B) 2CS e (C) 2RS, obtidos a partir do extrato alcalino de folhas, caules e raízes, respectivamente.....	89
FIGURA 35 - Fluxograma do processo de extração alcalina com NaOH 15% e fracionamento de polissacarídeos dos órgãos vegetais de <i>P. niruri</i> .	91
FIGURA 36 - Espectros de ^{13}C -RMN de (A) 15FS, (B) 15CS e (C) 15RS, obtidos a partir do extrato alcalino de folhas, caules e raízes, respectivamente.....	93
FIGURA 37 - Efeitos de AG-E10 na viabilidade de macrófagos.....	97
FIGURA 38 - Efeitos de AG-E10 na produção de ânion superóxido por macrófagos.....	98
FIGURA 39 - Efeitos de AG-E10 na produção de óxido nítrico por macrófagos.....	99
FIGURA 40 - Avaliação da atividade elicitora de AG-E10.....	100
FIGURA 41 - Processos de obtenção do suco gástrico e de análise de AG-E10 em meio ácido.....	102
FIGURA 42 - Cromatogramas obtidos em HPLC de AG-E10 submetida à hidrólise ácida com HCl com pH =2,00. (A) Perfis cromatográficos em diferentes tempos e (B) Sobreposição dos cromatogramas obtidos em diferentes tempos.....	103
FIGURA 43 - Cromatogramas obtidos em HPLC de AG-E10 submetida à hidrólise ácida com suco gástrico pH 1,95. (A) Perfis cromatográficos em diferentes tempos e (B) Sobreposição dos cromatogramas obtidos em diferentes tempos.....	104
FIGURA 44 - Cromatogramas obtidos em HPLC de AG-E10 submetida à hidrólise com suco gástrico pH 7,76. (A) Perfis cromatográficos em diferentes tempos e (B) Sobreposição dos cromatogramas obtidos em diferentes tempos.....	105
FIGURA 45 - Fluxograma de hidrólise ácida em HCl e fracionamento etanólico de AG-E10.....	107
FIGURA 46 - Perfis de eluição da arabinogalactana nativa e degradada analisadas em HPSEC.....	108
FIGURA 47 - Espectros de ^{13}C -RMN de (A) AG-E10 e (B) AG-E10S.....	110
FIGURA 48 - Efeitos de AG-E10S e AG-E10P na viabilidade de macrófagos.....	112
FIGURA 49 - Efeitos de AG-E10S e AG-E10P na produção de óxido nítrico por macrófagos.....	113
FIGURA 50 - Efeitos de AG-E10S e AG-E10P na produção de ânion superóxido por macrófagos.....	114

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - Composição monossacarídica das frações DEC-P e INF-P.....	58
TABELA 02 - Composição monossacarídica das frações DEC-E10 e INF-E10.....	60
TABELA 03 - Composição monossacarídica das frações DEC-E10, INF-E10, AG-E10 e AG-E10 carboxi-reduzida (CRAG-E10).....	66
TABELA 04 - Análise de metilação da fração CRAG-E10 (arabinogalactana).....	71
TABELA 05 - Composições monossacarídicas ao longo do processo de purificação do extrato alcalino (EB2).....	75
TABELA 06 - Análise de metilação da fração CR2PFEH (heteroxilana- carboxi-reduzida).....	79
TABELA 07 - Composição monossacarídica dos diferentes órgãos vegetais, extraídos em água.....	83
TABELA 08 - Composição monossacarídica dos diferentes órgãos vegetais, extraídos com KOH 2%.....	87
TABELA 09 - Composição monossacarídica dos diferentes órgãos vegetais, extraídos com NaOH 15%.....	92
TABELA 10 - Composição monossacarídica da arabinogalactana nativa e frações degradadas.....	109

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

γ -INF	- Gama interferon
^{13}C	- Carbono treze
Ac_2O	- Anidrido acético
AG	- Arabinogalactana
Ag_2CO_3	- Carbonato de prata
Ara	- Arabinose
BaCO_3	- Carbonato de bário
BMR	- Modificador de resposta biológica
BSA	- Soro albumina bovina
CH_3I	- Iodeto de metila
CHCl_3	- Clorofórmio
CuSO_4	- Sulfato de cobre
d.i.	- Diâmetro interno
D_2O	- Óxido de deutério
DEPT	- <i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DP	- Desvio padrão
EtOH	- Etanol
f	- Furanosídico
Fuc	- Fucose
Gal	- Galactose
GalA	- Ácido galacturônico
GC-MS	- Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
GlcA	- Ácido glucurônico
Glc	- Glucose
H_2O_2	- Peróxido de hidrogênio
H_2SO_4	- Ácido sulfúrico
HBSS	- Solução salina balanceada de Hanks
HCl	- Ácido clorídrico
HOAc	- Ácido acético
HPLC	- Cromatografia líquida de alta eficiência

HPSEC-MALLS	- Cromatografia de exclusão estérica acoplada à detecção por índice de refração e espalhamento de luz
i.p.	- Intraperitoneal
IL	- Interleucinas
IR	- Índice de refração
KOH	- Hidróxido de potássio
LPS	- Lipolissacarídeo
LS	- Espalhamento de luz
Man	- Manose
Me ₂ SO	- Dimetilsulfóxido
Me ₂ SO- <i>d</i> ₆	- Dimetilsulfóxido deuterado
MEM	- Meio mínimo essencial
MeOH	- Metanol
MTT	- Brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-25
NaBD ₄	- Boroidreto de sódio deuterado
NaBH ₄	- Boroidreto de sódio
NaN ₃	- Azida sódica
NaNO ₂	- Nitrato de sódio
NaOAc	- Acetato de sódio
NaOH	- Hidróxido de sódio
NH ₄ OH	- Hidróxido de amônio
NK	- Natural killer
NO	- Óxido nítrico
nPrOH	- n-Propanol
O ₂ ⁻	- Ânion superóxido
<i>p</i>	- Piranosídico
p/v	- Peso/volume
PBS	- Solução salina tamponada
pH	- Potencial hidrogeniônico
PMA	- Éster de forbol 12-meristato13-acetato
ppm	- Partes por milhão
Rha	- Ramnose

RMN	- Ressonância magnética nuclear
rpm	- Rotações por minuto
TFA	- Ácido trifluoracético
TLC	- Cromatografia em sílica gel
v/v	- Volume/volume
Xyl	- Xilose

RESUMO

Este estudo foi desenvolvido com extratos de *Phyllanthus niruri*, um fitoterápico de ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais do globo, popularmente conhecido como quebra-pedra. O trabalho traz uma abordagem química e biológica dos carboidratos que compõem a planta. O enfoque químico trata do isolamento e caracterização de polissacarídeos obtidos a partir de diferentes formas de extração. Os extratos aquosos foram realizados nas formas de infusão, decocção e extração exaustiva à quente. A partir destes extratos foi isolada e caracterizada uma arabinogalactana péctica do tipo I, de estrutura complexa. Este polissacarídeo apresentou cadeia principal constituída por unidades de β -Galp (1 \rightarrow 4), parcialmente substituída por cadeias laterais contendo Rhap, GalpA, Araf, Galp e Glcp. A molécula apresentou terminais não-redutores de Araf, Xylp, Rhap, Manp, Galp, e Glcp. Foram também realizadas extrações alcalinas com KOH 2% que forneceram uma heteroxilana ácida, também de estrutura complexa. A molécula apresentou cadeia principal constituída por unidades de β -Xylp (1 \rightarrow 4), parcialmente substituída por cadeias laterais constituídas por unidades de Rhap, Araf e 4-O-Me-GlcpA. A molécula apresentou terminais não-redutores de Araf, Xylp, Galp, Glcp e GlcpA. Com o intuito comparativo, foram também realizadas extrações a partir dos órgãos vegetais separados: folhas, caules e raízes. Os extratos aquosos dos órgãos vegetais apresentaram grande similaridade, sugerindo a presença de arabinogalactanas como principal componente. Já os extratos alcalinos, obtidos com KOH 2% apresentaram algumas diferenças, especialmente quanto ao polissacarídeo que compõe as folhas. Sugere-se que a amostra obtida das folhas seja constituída, majoritariamente, por uma arabinogalactana; já os extratos obtidos dos caules e raízes são constituídos por heteroxilanas, polissacarídeo caracterizado ao se realizar extratos com a planta inteira. Foram ainda realizadas extrações com NaOH 15% e os resultados obtidos apontam a presença de xilanas substituídas e/ou xiloglucanas compondo o extrato das folhas, enquanto os dos caules e raízes são constituídos por xilanas pouco substituídas. O enfoque biológico do trabalho foi desenvolvido com a arabinogalactana obtida a partir dos extratos aquosos realizados com a planta inteira. Os testes *in vitro* realizados em macrófagos peritoneais de camundongos apontaram que o polissacarídeo é capaz de aumentar a produção de O_2^- em 3 vezes, não interferindo na produção de NO. Foi ainda observada uma atividade elicitora de células ao tratar os animais com o polissacarídeo por 24 h, alcançando um aumento máximo de células no exsudato peritoneal de 2,3 vezes na dose de 100 mg.kg⁻¹. Por fim, o trabalho ainda avaliou o processo de digestão parcial da arabinogalactana, mimetizando condições ácidas estomacais. Ao se submeter a arabinogalactana à hidrólises ácidas a 37° C, por até 3 h com suco gástrico e HCl foi observado que o polissacarídeo sofre alterações químicas decorrentes deste tratamento e que, ao contrário do esperado, o processo de digestão estomacal fragmenta a molécula de forma intensa. Fragmentos de alta e baixa massa molar da arabinogalactana parcialmente degradada foram também testados em macrófagos peritoneais de camundongos e foi observada uma ativação máxima da produção de O_2^- em 2 vezes para a fração de baixa massa molar e 2,3 vezes para a fração de alta massa molar, indicando uma relação estrutura / atividade, na qual o tamanho, a conformação e/ou a seqüência monossacarídica estão envolvidas.

ABSTRACT

This study was developed using extracts of *Phyllanthus niruri*, known as stone-breaker (quebra-pedra), a medicinal herb widely distributed throughout tropical and subtropical regions. The work presents a chemical and biological focus on the carbohydrates present in the plant. The chemical approach deals with the isolation and characterization of polysaccharides obtained from different extraction procedures. Aqueous extractions were carried through in form of teas, as decoction and infusion, and exhaustively in hot water. From these extracts, a complex type I arabinogalactan was characterized. The pectic polymer presented a main chain constituted by a (1→4)-linked β -Galp, partially substituted by Rhap, GalpA, Araf, Galp e Glcp side chains, with nonreducing end units of Araf, Xylp, Rhap, Manp, Galp, and Glcp. Extractions using 2% aq. KOH were also carried out, affording an acidic heteroxylan with a complex structure. The polysaccharide had a (1→4)-linked β -Xylp main-chain, partially substituted by Rhap, Araf, and 4-*O*-methylglucuronic acid side chains, with nonreducing end units of Araf, Xylp, Galp, Glcp, and nonmethylated glucuronic acid. The next step was on the extraction and fractionation of polysaccharides from the different organs from the plant, aiming to compare the content of each organ. These results comprise samples obtained from leaves, stems, and roots. The aqueous extracts of the plant organs were very similar among themselves, suggesting the presence of an arabinogalactan as a main component. The alkaline fractions, obtained from 2% aq. KOH extractions, presented some differences, specially concerning the leaf extracts, which also contained an arabinogalactan as a major polysaccharide. On the other hand, the fractions obtained from the stems and roots were composed of a heteroxylan, similar to that of the whole plant. Extractions using 15% aq. NaOH were also carried out, and the extracts from the leaves presented substituted xylans and/or xyloglucans. The extracts from the stems and roots were very similar, in terms of the carbohydrate content, and afforded poorly substituted xylans. The biological approach of this study was carried out with the arabinogalactan, obtained from the aqueous extracts from the whole plant. The *in vitro* assays were conducted on the peritoneal macrophages of mice, and the polysaccharide was able to stimulate O_2^- production in 3 fold, but did not interfere with the nitric oxide pathway. Cell eliciting activity was also observed in the polysaccharide-treated animals after 24 h treatment, achieving an increase of 2.3 times at a dose of 100 mg.kg⁻¹. A third approach of this work consisted of analyses of a partial digestion of the arabinogalactan, miming gastric conditions. The arabinogalactan was submitted to acid hydrolyses with HCl and gastric juice from human volunteers, at 37 °C, for a maximum of 3 h. It was possible to observe a partial degradation of the polysaccharide to a much higher proportion than that expected. Fragments from the native polymer were also tested in the peritoneal macrophage of mice, and resulted in 2 and 2.3 fold activation of O_2^- production for the low and high molar mass fragments, respectively. These results indicate a structure/activity relationship, in which the size, conformation and/or monosaccharide sequence may be involved.

1. INTRODUÇÃO

As plantas constituem a mais rica fonte natural de biomoléculas utilizadas pelo homem. O uso de plantas com propriedades curativas é evidenciado desde a era pré-histórica, em que sociedades primitivas buscavam a cura terapêutica e psicoterapêutica através de preparações botânicas (HALBERSTEIN, 2005).

Com o passar do tempo e o desenvolvimento industrial, o uso de plantas medicinais passou a ser uma forma de tratamento secundário, pois o desenvolvimento de compostos sintéticos assumiu a liderança frente aos tratamentos alopáticos. No entanto, a última década foi marcada por um grande desagrado da população em relação aos tratamentos medicamentosos convencionais (BRISKIN, 2000), uma vez que o custo de medicamentos industrializados passou a ser muito elevado e o desenvolvimento de pesquisas científicas demonstrou uma enorme diversidade de efeitos adversos produzidos pelo uso destas drogas (KESSLER et al., 2001).

Assim, o uso de medicamentos fitoterápicos, ou seja, à base de plantas com propriedades medicinais re-emergiu na sociedade guiado por um forte apelo da busca pelo natural, associado aos baixos custos no tratamento (GLASER, 1999).

Atualmente, as pesquisas científicas em torno de plantas medicinais apresentam focos majoritários definidos nas áreas da fitoquímica, farmacognosia e horticultura. A fitoquímica é responsável pela caracterização de possíveis compostos bioativos, enquanto a farmacognosia contempla ensaios de bioatividade, identificação do modo de ação e sítios ativos para ação de fitoquímicos (BRISKIN, 2000).

No que tange aos compostos químicos de origem vegetal, faz-se importante abordar uma classe primária de biomoléculas: os carboidratos, especialmente os polissacarídeos. Durante muito tempo, os carboidratos foram considerados importantes para o homem somente do ponto de vista nutricional, no entanto, muito se tem investigado sobre as diferentes estruturas destas moléculas e suas potenciais aplicações biológicas (BOHN e BEMILLER, 1995). Polissacarídeos de diferentes fontes naturais têm apresentado diversas atividades biológicas, incluindo propriedades antiviral (TALARICO et al., 2004), leishmanicida (NOLETO et al., 2002), antitumoral

(STUELP-CAMPELO et al., 2002; PENG et al., 2005) e anticoagulante (MARTINICHEN-HERRERO et al., 2005a, b).

Diversas classes de polissacarídeos têm apresentado aumento na resposta imunológica de vários organismos e células, sendo classificados como moléculas imunomoduladoras ou modificadoras de resposta biológica (MRB) (BOHN e BEMILLER, 1995). O uso de macrófagos na detecção de moléculas imunomodulatórias mostra-se um modelo adequado para a realização de experimentos tanto *in vitro* como *in vivo*, uma vez que estas células são amplamente distribuídas no organismo animal e são responsáveis por processos homeostáticos, imunológicos e antiinflamatórios (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). A literatura aponta algumas respostas de macrófagos frente a diferentes polissacarídeos, sendo já observadas alterações no “burst” respiratório, resultando no aumento ou diminuição da produção de ânion superóxido (O_2^-) e alterações na produção de óxido nítrico (NO). (HASHIMOTO, OHNO e YADOMAE, 1997; MORETÃO et al., 2003; MORETÃO et al., 2004).

Tendo em vista a necessidade social de investimentos científicos voltados ao estudo de plantas medicinais, associados à carência de informações quanto à caracterização química e aplicação biológica de polissacarídeos que compõem estes vegetais, este estudo traz uma abordagem química e biológica a respeito de carboidratos que compõem a quebra-pedra (*Plyllanthus niruri*), um fitoterápico de grande difusão nas regiões tropicais e subtropicais do globo. Assim, o presente trabalho traz três abordagens: a) O enfoque químico, no qual foi realizada a caracterização de polissacarídeos obtidos a partir de diferentes formas de extração, bem como de diferentes órgãos vegetais de *P. niruri*; b) o enfoque biológico, no qual foi avaliado os efeitos destes polissacarídeos em macrófagos peritoneais de camundongos *in vitro* e *in vivo*; c) o enfoque fisiológico, o qual trata do comportamento de polissacarídeos frente a condições digestivas, pois sabendo-se que o uso de quebra-pedra e de inúmeras outras plantas medicinais se faz por meio da ingestão de chás, é conveniente investigar, neste momento, as biotransformações que os polissacarídeos podem sofrer no decorrer do processo digestivo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 INTRODUÇÃO AOS POLISSACARÍDEOS DE VEGETAIS SUPERIORES

Os carboidratos certamente constituem, após a água, o principal componente químico presente nas células e tecidos de organismos vegetais. Tais compostos podem ser basicamente classificados em dois grandes grupos, os de reserva e os estruturais (AVIGAD e DEY, 1997).

Os carboidratos de reserva acumulados no vegetal funcionam como provedores de monossacarídeos os quais são metabolicamente utilizados durante o crescimento e desenvolvimento da planta. Dentre os carboidratos de armazenamento, pode-se observar a presença de monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos e seus derivados. O amido, a sacarose e as frutanas são os carboidratos de reserva mais abundantes e metabolizáveis em plantas. Em adição ao amido e aos polímeros de frutose, as plantas produzem outros polissacarídeos que também podem ser considerados de reserva. Dentre estes, as galactomananas constituem o principal grupo presente nas sementes de muitos vegetais (AVIGAD e DEY, 1997).

A outra classe de carboidratos vegetais, chamados estruturais, constituem os compostos naturais mais abundantes na Terra, sendo a mais importante fonte de reciclagem de carbono. Salvo raras exceções, estes carboidratos encontram-se nas paredes celulares, que envolvem as células vegetais (REID, 1997).

2.2 PAREDE CELULAR VEGETAL

A parede celular vegetal foi considerada, durante muitos anos, um envoltório celular morto e amorfo. Atualmente, sabe-se do complexo grau de estruturação da parede celular e das diversas funções que esta desempenha na vida do vegetal (BRETT e WALDRON, 1990). Este envoltório celular está presente em todas as células de vegetais superiores, com exceção de poucas, como os gametas (YORK et al., 1985; SCHINDLER, 1998). A importância da parede celular para a vida do vegetal dá-se

pelas variadas funções que ela apresenta, sendo essencial na determinação da forma celular, da textura do tecido e da morfologia final do vegetal, através da força mecânica e rigidez que apresenta (RAVEN, EVERT e EICHORN, 1999; REID, 1997).

A parede celular é ainda de extremo valor quanto à proteção das células ao ataque de patógenos, pois ao degradarem-se parte dos polissacarídeos da parede celular, os oligossacarídeos gerados difundem ao redor das células vizinhas, promovendo reações de defesa local (BRETT e WALDRON, 1990), além de ativarem genes responsáveis pela síntese de fitocompostos, como por exemplo, a produção de fitoalexinas e antibióticos (BOWLES, 1990). Outra importante participação da parede celular na comunicação célula-célula, deve-se à necessidade de absorção, transporte e secreção de substâncias entre as células do vegetal, que são dependentes da parede celular (BRETT e WALDRON, 1990).

A parede celular de vegetais superiores é composta majoritariamente por carboidratos, os quais estão associados a proteínas (HELDT, 1997). A fração glicídica consiste de microfibrilas de celulose entrelaçadas em uma fase contínua de pectina e hemicelulose, além da lignina presente em paredes celulares secundárias (Figura 01) (WHISTLER, 1970). A distribuição destes polímeros na parede celular já deu origem a vários modelos estruturais, propostos na tentativa de desvendar a real estrutura da parede celular, que se encontra dividida em primária e secundária.

A parede celular primária é encontrada em células jovens, sendo de fundamental importância no processo de expansão celular (REID, 1997). É também observada em células de tecidos suculentos e parenquimáticos das folhas e frutos (FRESHOUR et al., 1996). A composição química da parede celular primária de dicotiledôneas é de, aproximadamente, 25-40% de celulose, 15-25% de hemicelulose, 15-40% de substâncias pécicas, 5-10% proteínas e traços de compostos fenólicos (AVIGAD e DEY, 1997).

Já a parede celular secundária encontra-se entre a primária e a membrana plasmática da célula, conferindo rigidez aos tecidos vegetais (REID, 1997). A conversão da parede primária em secundária ocorre após o processo de lignificação, o qual interrompe o crescimento celular, e indica, portanto, o amadurecimento celular e

a diferenciação terminal da célula (ALBERSHEIM et al., 1996). A constituição química deste tipo de parede, em dicotiledôneas, passa a ser de 40-45% de celulose, 15-35% de hemicelulose, 15-30% de lignina e traços de pectina (AVIGAD e DEY, 1997).

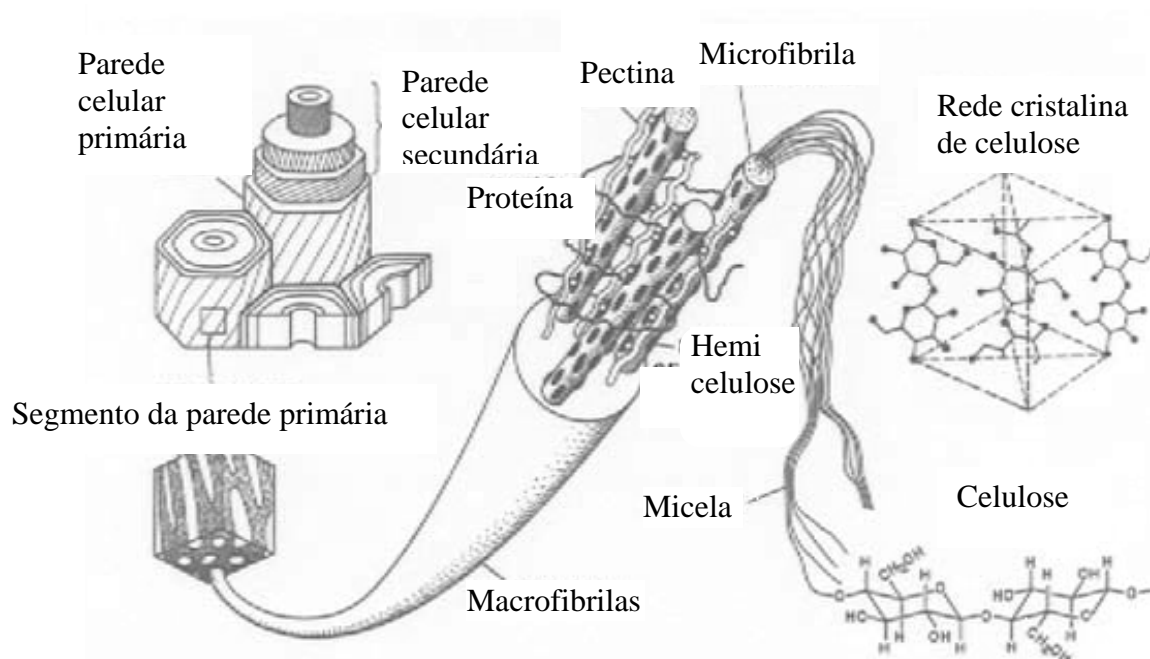


Figura 01 - Organização da parede celular em vegetais superiores.

(Fonte: adaptado de NIKLAS, 2000)

Do ponto de vista químico, as pectinas, a celulose e as hemiceluloses podem ser diferenciadas desde as formas de extração. As pectinas são extraídas por meio de soluções aquosas de oxalato de amônio ou EDTA, as quais são capazes de quelar o cálcio ou outros cátions metálicos divalentes. As hemiceluloses são mais difíceis de serem removidas da parede celular, requerendo-se, além do uso de água, o uso de soluções alcalinas, como hidróxido de sódio ou potássio. A celulose por sua vez é obtida a partir dos resíduos da extração de pectinas e hemiceluloses sendo, portanto, não solúvel em álcali (AVIGAD e DEY, 1997).

2.3 HEMICELULOSES

O termo hemicelulose foi proposto pela primeira vez por Schulze, em 1891, no intuito de designar polissacarídeos extraídos de plantas através de soluções alcalinas (WHISTLER, 1970). No entanto, tem-se relato de diversos polissacarídeos extraídos com água, como as arabinogalactanas e glucomananas que são também considerados hemiceluloses (FENGEL e WEGNER, 1989). Para alguns autores, o termo hemicelulose refere-se aos polissacarídeos de baixa massa molar, encontrados na parede celular de plantas terrestres, que se associam com a celulose e a lignina (COLLINS e FERRIER, 1995). REID (1997) conceitua as hemiceluloses como polímeros da parede celular que apresentam um tipo particular de estrutura molecular e exercem uma determinada função nesta parede. GABRIELLI e colaboradores (2000) adotam a definição descrita por ASPINALL (1969) e TIMELL (1964), na qual o termo hemicelulose refere-se aos polissacarídeos presentes em tecidos vegetais que ocorrem juntamente com a celulose e que podem ser isolados através de extrações aquosas ou, mais frequentemente, alcalinas.

Apesar da dificuldade conceitual do termo hemicelulose, muito se tem relatado sobre esta ampla diversidade de polímeros que constituem cerca de 20% do peso seco da parede celular dos vegetais. A composição química, abundância e distribuição das hemiceluloses dependem da espécie, tecido e condições de crescimento do vegetal (WHISTLER e Be MILLER, 1959; KITAYAMA et al., 2000). Outro fator determinante na caracterização de hemiceluloses é a idade da planta, sendo a maturidade do vegetal de grande influência na composição e abundância de diferentes polímeros (BUCHALA e WILKIE, 1974). Uma vez que existe uma ampla diversidade metodológica para a purificação de hemiceluloses, a caracterização destes polissacarídeos será dependente do protocolo utilizado (GHALI, YOUSSEF e MOBDY, 1974; CARPITA, 1984).

As hemiceluloses são constituídas por unidades monossacarídicas de D-xilose, D-manose, D-galactose, D-glucose, L-arabinose, ácido 4-*O*-metilglucurônico, ácido D-galacturônico e ácido D-glucurônico, sendo que eventualmente apresentam

grupamentos *O*-acetil ligados às unidades pertencentes às cadeias principal e/ou lateral (FENGEL e WEGNER, 1989). Estes monossacarídeos encontram-se glicosidicamente ligados, constituindo diferentes polissacarídeos, sendo os principais incluídos nas classes denominadas arabinogalactanas, arabinoxilanas, xilanas, galactoglucomananas, glucuronoxilanas, glucomananas, mananas e xiloglucanas (PULS e SCHUSEIL, 1993; KACURÁKOVÁ et al., 2000).

Considerando a relevância com a qual as xilanas serão abordadas neste trabalho, o próximo item traz uma breve revisão sobre esta classe de polissacarídeos.

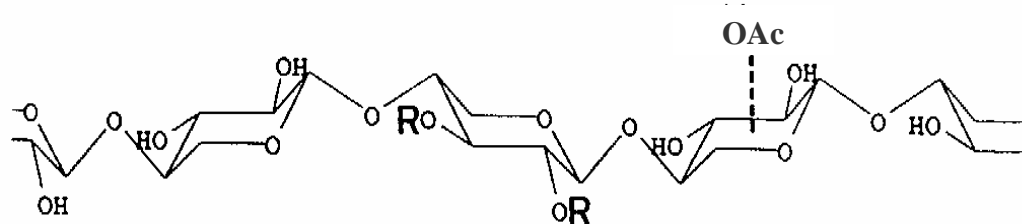
2.3.1 Xilanas

Dentre os diversos polímeros de hemicelulose, as xilanas são os polissacarídeos mais representativos da parede celular de plantas terrestres (JOSELEAU, COMTAT e RUEL, 1992), encontradas em todos os vegetais superiores e em quase todas as partes do vegetal (WHISTLER, 1970). Presume-se que as xilanas contribuam com cerca de um terço das fontes de carbono orgânico reciclável disponíveis na natureza (GABRIELLI et al., 2000).

Estes polissacarídeos são encontrados, principalmente, na parede celular secundária dos tecidos, apresentando funções estruturais, ou ainda, em paredes celulares primárias de bulbos e sementes, com função de reserva (JOSELEAU, COMTAT e RUEL, 1992; YUI et al., 1995; DINAND e VIGNON, 2001). Nas paredes celulares secundárias dos vegetais, as xilanas formam pontes de hidrogênio com a celulose, ligações covalentes com as ligninas e podem formar ligações do tipo éster com grupamentos acetil e ácidos fenólicos. Sendo assim, esta classe de polímeros apresenta-se fortemente comprometida com a formação da parede celular dos vegetais. BUCHALA e WILKIE (1974) e MIGNÉ, PRENSIER e GRENET (1994) demonstraram que o amadurecimento do vegetal e a conseqüente lignificação dos tecidos promovem um aumento no conteúdo de xilanas caracterizadas da cevada e do milho, respectivamente. Devido à forte associação das xilanas na parede celular vegetal, esta classe de hemiceluloses requer o uso de soluções alcalinas mais

concentradas para serem extraídas (CARPITA, 1984; SUN et al., 2001; KITAYAMA et al., 2000).

As xilanas caracterizadas de diferentes espécies vegetais apresentam grande variedade estrutural, porém o esqueleto desta classe de polissacarídeos é normalmente formado por unidades de β -xilopiranosose ligadas (1 \rightarrow 4). Dentre a grande variedade estrutural das xilanas, as heteroxilanas são mais comumente encontradas em plantas terrestres, sendo normalmente observados substituintes monossacarídicos neutros ou ácidos, ou ainda, cadeias laterais oligossacarídicas ligadas à cadeia principal β -(1 \rightarrow 4) xilopiranosil (JOSELEAU, COMTAT e RUEL, 1992; DINAND e VIGNON, 2001), além da intensa presença de grupamentos *O*-acetil (REICHER e CORRÊA, 1982; REICHER, GORIN e CORRÊA, 1984; REICHER et al., 1989, 1994). A Figura 02 mostra as principais substituições encontradas nos esqueletos das xilanas, sendo estas nos carbonos C-2 e C-3 das unidades de β -D-xilopiranosose. São poucos os relatos de homoxilanas lineares isoladas de plantas terrestres: como exemplo, xilanas do talo de tabaco (EDA, OHNISHI e KATO, 1976) e da casca da semente de guar (*Cyamopsis tetragonolobus*) (JOSELEAU, COMTAT e RUEL, 1992).



R: α -D-GlcpA-(1 \rightarrow 2)
 4-*O*-Me- α -D-GlcpA-(1 \rightarrow 2)
 α -L-Araf-(1 \rightarrow 3)
 α -L-Araf-(1 \rightarrow 2)
 β -D-Galp-(1 \rightarrow 5) α -L-Araf-(1 \rightarrow 3)
 β -D-Xilp-(1 \rightarrow 2) α -L-Araf-(1 \rightarrow 3)

R: α -L-Araf-(1 \rightarrow 2, 1 \rightarrow 3 e 1 \rightarrow 2,3
 ----Araf)_n-(1 \rightarrow 3)
 ----Feruloil
 ----Cumaroil
 ----Lignina
 ----(OAc): *O*-acetil

Figura 02- Principais cadeias laterais substituintes do esqueleto β -(1 \rightarrow 4) xilopiranosil.
 FONTE: JOSELEAU, COMTAT e RUEL, 1992.

Apesar da literatura conhecer a importância das xilanas para a manutenção da vida do vegetal e a estrutura básica destes polissacarídeos de longa data, muita atenção tem sido dada a esta classe de hemiceluloses, uma vez que a estrutura fina destes polímeros está intimamente relacionada com propriedades industriais e biológicas.

No que tange às propriedades industriais, diversos trabalhos científicos apontam as heteroxilanas como a principal fonte de fibras solúveis (“non starch polysaccharides”) contidas em grãos, como por exemplo, no trigo, sorgo (NANDINI e SALIMATH, 2001; DERVILLY-PINEL, TRAN e SAULNIER, 2004), malte e cevada (HAN, 2000). Uma vez que estes polissacarídeos podem formar uma solução altamente viscosa na presença de água, é de fundamental importância conhecer a estrutura fina destas macromoléculas para traçar uma relação entre viscosidade e estrutura, maximizando os processos de panificação e obtenção de cerveja, dentre outros processos industriais.

As propriedades biológicas descritas para as heteroxilanas serão abordadas no item 2.6, onde serão analisadas as respostas biológicas de diversas classes de polissacarídeos.

2.4 PECTINAS

A definição do termo pectina, quando quimicamente abordada, vem sendo reformulada, nos últimos 70 anos de estudo, por grupos de pesquisa altamente qualificados na química de carboidratos (RIDLEY, O'NEILL e MOHNEN, 2001). O'NEILL, ALBERSHEIM e DARVILL, em 1990 trazem definições atuais sobre pectinas e polissacarídeos pécticos. Segundo estes autores, pectina refere-se a “uma família de polissacarídeos complexos que contem unidades de ácido α -D-galacturônico (GalpA)”. Esta família compreende três classes de polímeros, denominados de polissacarídeos pécticos: homogalacturonanas, ramnogalacturonanas do tipo I e galacturonanas substituídas, dentre as quais encontram-se as ramnogalacturonanas do tipo II.

Ainda segundo O'NEILL et al. (1990), defini-se por homogalacturonana o polissacarídeo que apresenta “uma cadeia linear constituída por unidades de ácido α -D-galacturônico, unidas por ligações do tipo 1 \rightarrow 4, sendo alguns grupamentos carboxílicos esterificados por metanol (ésteres de metil)”. Existem, ainda, estudos que identificam a presença de grupamentos *O*-acetil substituindo os C-2 ou C-3 (ISHII, 1997).

Já as ramnogalacturonanas do tipo I (RGI) são uma classe de polissacarídeos que contém a cadeia principal constituída por unidades alternadas de ácido α -D-galacturônico ligadas em C-4 e unidades de α -L-ramnose ligadas em C-2, formando o dissacarídeo [\rightarrow 4) α -D-GalpA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow)] repetidas vezes.

Em geral, as unidades de α -D-GalpA não se encontram substituídas, no entanto, percentuais bem variados de α -L-Rhap (20 a 80%) podem estar substituídas em C-4 por cadeias laterais diversas (O'NEILL et al., 1990). Estes substituintes geralmente apresentam unidades de arabinose e/ou galactose, podendo ser oligossacarídeos ou polissacarídeos como arabinanas, galactanas e/ou arabinogalactanas (SMITH, 1993; McNEIL et al., 1984; REID, 1997) (Figura 03). Também já foram observadas cadeias laterais constituídas por α -fucose, ácido β -glucurônico, ácido β -4-*O*-metilglucurônico e ácidos ferrúlico ou cumárico (O'NEILL et al., 1990).

As variadas cadeias laterais presentes nas RGIs geram moléculas de alta complexidade, inclusive algumas regiões moleculares intensamente substituídas são conhecidas como “regiões em cabeleira” (*hairy regions*).

Finalmente, a terceira classe de polissacarídeos pécticos é chamada de galacturonanas substituídas (GS) que são um “grupo diverso de polissacarídeos que apresentam a cadeia principal constituída por unidades de ácido α -D-galacturônico, unidas por ligações do tipo 1 \rightarrow 4” (O'NEILL et al., 1990). No caso específico das ramnogalacturonanas do tipo II (RGII), as cadeias laterais são, geralmente, substituintes em C-2 das unidades de α -D-GalpA e são formadas por oligossacarídeos contendo açúcares pouco usuais, como a fucose, o ácido acérico, a apiose e o ácido 3-deoxi-mano-octulosônico (SMITH, 1993).

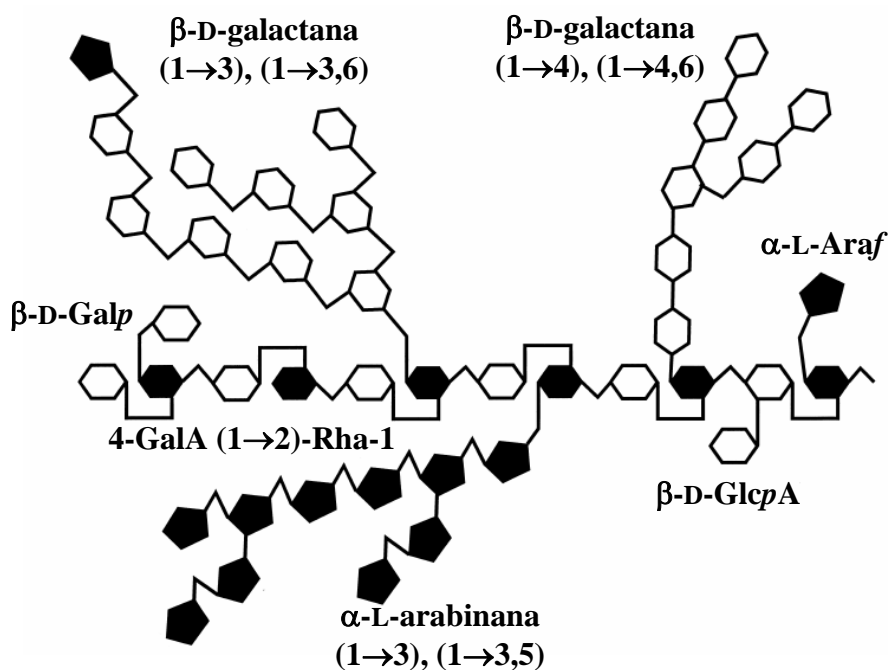


Figura 03 – Modelo estrutural de uma ramnogalacturonana do tipo I.
 FONTE: RIDLEY, O'NELLY e MOHNEN, 2001.

O alto grau de complexidade destas moléculas, associado às propriedades formadoras de gel quando em solução aquosa, faz destas moléculas um enorme desafio para químicos de carboidratos, os quais passam anos desvendando um emaranhado molecular (CARPITA e GIBEAUT, 1993), que vêm sendo cada vez mais usado, tanto industrialmente quanto em aplicações biológicas.

As arabinogalactanas compõem, em parte, as cadeias laterais das RGI, no entanto, como podem existir independentemente das pectinas na parede celular, serão abordadas em um item aparte, a seguir.

2.5 ARABINO GALACTANAS

Uma vez que as arabinogalactanas podem ser consideradas polissacarídeos hemicelulósicos ou pécticos, esta classe de macromoléculas será tratada à parte, neste item.

As arabinogalactanas (AGs) são polissacarídeos estruturais, presentes em todos os vegetais superiores (FINCHER, STONE e CLARK, 1983), tendo uma estrutura molecular complexa e de difícil caracterização (WHISTLER 1970; ASPINALL, 1982). A literatura mostra diversos trabalhos envolvendo a elucidação estrutural destes polímeros, encontrados em folhas, caules, raízes, flores, sementes e, em grande quantidade, em gomas e exsudatos de vegetais (FINCHER, STONE e CLARK 1983; MENESTRINA et al., 1998; DELGOBO et al., 1998, 1999).

Uma vez que estes polissacarídeos geralmente apresentam viscosidade em solução, existe um grande interesse comercial voltado à elucidação destes compostos, descritos desde a década de setenta, por WHISTLER (1970). Dentro do âmbito industrial, pode-se citar o intenso uso de arabinogalactanas da tão conhecida goma arábica (*Acácia Senegal*), proveniente de árvores de diferentes espécies de *Acácia*. Já com enfoque biológico, as principais arabinogalactanas utilizadas são provenientes do lariço (*Larix occidentalis* e *Larix dahurica*), uma árvore típica da região norte do globo, sendo descrita por apresentar propriedades imunomoduladoras.

A elucidação estrutural das arabinogalactanas é também importante para uma maior compreensão da real estrutura da parede celular primária de vegetais superiores. O grupo de Albersheim propôs o primeiro modelo estrutural de parede celular (Figura 04), no qual as arabinogalactanas seriam formadas por uma cadeia de arabinose ligada a outra de galactose, contendo poucas ramificações, formadas apenas por uma unidade monossacarídica cada. Neste modelo estrutural, cada fibra de celulose estaria coberta por várias moléculas de xiloglucanas, as quais estariam covalentemente ligadas a uma unidade interna de galactose da arabinogalactana. A unidade terminal de galactose da molécula estaria covalentemente ligada a uma cadeia de ramnogalacturonana, estando esta cadeia ligada a várias moléculas de arabinogalactana (ALBERSHEIM, 1975).

Desde este modelo, muitos avanços foram observados tanto em relação à parede celular quanto em relação à caracterização de seus constituintes químicos. Um modelo mais recente da estrutura da parede celular foi proposto por CARPITA e GIBEAUT (1993), no qual as (1→5)- α -L-arabinanas e as arabinogalactanas formam muitas cadeias laterais nas unidades de ramnose das cadeias de ramnogalacturonanas. CARPITA e GIBEAUT (1993) também se referem à diversidade estrutural e ao alto grau de complexidade que estes polissacarídeos podem assumir, além da associação com proteínas, constituindo uma classe especial de moléculas, as arabinogalactana-proteínas (AGPs).

ASPINALL (1973), ao perceber as diferenças quanto às ligações químicas envolvidas na cadeia principal destas macromoléculas, classificou as AGs em dois grandes grupos: as arabinogalactanas do tipo I, pouco ramificadas e com cadeias principais de (1→4) β -D-galactanas, e as do tipo II, altamente ramificadas, constituídas por cadeias principais de (1→3) e/ou (1→6) β -D-galactanas.

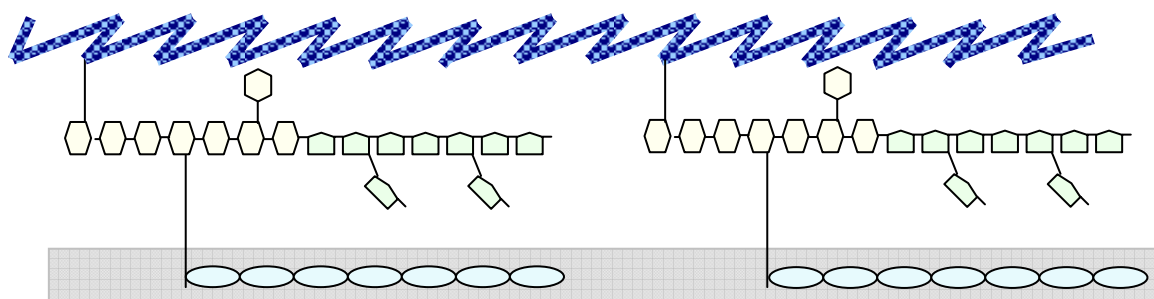


Figura 04 - Modelo esquemático da estrutura da parede celular primária de vegetais, proposto por ALBERSHEIM (1975).

Em azul escuro está representada a cadeia de ramnogalacturonana, em amarelo, as unidades de galactose da arabinogalactana, em verde, as unidades de arabinose da arabinogalactana, em azul claro, as cadeias de xiloglucanas, em cinza, uma fibra de celulose e as linhas em preto, as ligações covalentes.

2.5.1 Arabinogalactanas do Tipo I

As arabinogalactanas do tipo I (AGI) são também chamadas de pécnicas, pois são encontradas como cadeias laterais que ramificam as pectinas (ASPINALL, 1980;

FINCHER, STONE e CLARKE, 1983; KACURÁKOVÁ et al., 2000). Estes polissacarídeos são constituídos por uma cadeia principal de β -D-galactopiranoses ligadas (1 \rightarrow 4), substituídas por unidades de arabinose e galactose. Segundo ASPINALL (1982), STEPHEN (1983) e CARPITA e GIBEAUT (1993), as unidades substituintes são, geralmente, ligadas ao O-3 da cadeia principal de β -D-galactana (Figura 05) e o conteúdo de arabinose que esta classe de AGs pode apresentar é muito variável, podendo chegar a 50%.

A literatura clássica, construída entre as décadas de 60 e 80, apresentava definições extremamente engessadas quando à caracterização química de polissacarídeos. Atualmente, diversos trabalhos científicos têm demonstrado uma maior diversidade estrutural de moléculas quando comparada com moléculas caracterizadas no passado. Tendo-se como exemplo as AGI, a literatura atual demonstrou estruturas químicas com alto grau de complexidade, contendo, além de arabinose e galactose, monossacarídeos como ramnose, xilose, manose e glucose. A diversidade das AGI não é observada somente na composição monossacarídica, como também na massa molar e nas ligações glicosídicas entre as unidades que compõem as cadeias laterais destas moléculas (CAPEK et al., 2003; DIALLO et al., 2003; KARDOSOVÁ et al., 2004; CIPRIANI et al., 2004).

Outro aspecto de grande interesse em relação a estas macromoléculas é o significativo aumento da descrição de propriedades biológicas para estes polissacarídeos, como apresentado no item 2.6.1.

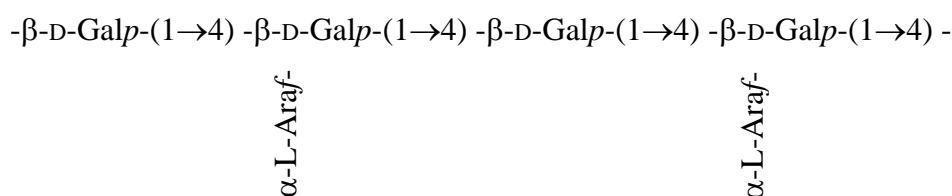


Figura 05 - Estrutura das arabinogalactanas do tipo I.

FONTE: CARPITA e GIBEAUT, 1993.

2.5.2 Arabinogalactanas do Tipo II

As arabinogalactanas do tipo II (AGII) constituem uma ampla classe de biomoléculas, pois, apesar de apresentarem uma estrutura geral semelhante, a estrutura fina destas moléculas varia muito de espécie para espécie (CARPITA & GIBEAUT, 1993; ALBERSHEIM et al., 1996). Já foram observadas AGs de diferentes massas molares, desde moléculas com 9 kDa (PRESCOTT et al., 1995) até 100 kDa (D'ADAMO, 1990). A composição monossacarídica também pode apresentar variações, podendo o conteúdo de arabinose atingir até 80%. Em algumas moléculas já caracterizadas são ainda observadas outras unidades monossacarídicas neutras, além da presença de D-GlcpA, 4-*O*-metil-D-GlcpA e D-GalpA (STEPHEN, 1983).

As estruturas moleculares de arabinogalactanas do tipo II são altamente ramificadas, sendo denominadas por diversos autores como “região cabeluda” que ramifica as ramnogalacturonanas da parede celular. A cadeia principal destas moléculas é, geralmente, pequena e constituída por β -D-Galp (1 \rightarrow 3), porém podem ainda ser observadas cadeias formadas por β -D-Galp (1 \rightarrow 6), ou ainda β -D-Galp (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 6). As ramificações incluem cadeias laterais constituídas por unidades de β -D-Galp, β -D-Galp substituídas por α -L-Araf (1 \rightarrow 3) e cadeias de α -L-Araf (1 \rightarrow 5). As ramificações podem ainda conter unidades de D-GlcpA, 4-*O*-metil-D-GlcpA e D-GalpA (Figura 06) (Mc NEIL et al., 1984; ASPINALL, 1969; FINCHER et al., 1983; STEPHEN, 1983).

As AGs do tipo II estão presentes na parede celular do vegetal, ramificando ou não, as ramnogalacturonanas através de ligações entre unidades que constituem as ramificações e os O-2 de unidades de L-Rhap ou D-Galp de substâncias pécticas e gomas (STEPHEN, 1983). No entanto, é comum observar a associação destas arabinogalactanas com proteínas, constituindo uma classe de proteoglicanas essencial na regulação da expansão e divisão celular, chamadas de arabinogalactanas-proteínas (SCHINDLER et al., 1998).

intestinal (SANZ et al., 2005; NEWBURG, RUIZ-PALACIOS e MORROW, 2005; LEWIS, BURMEISTER e BRAZIER, 2005; MARLETT e FISHER, 2003).

Um grupo de polissacarídeos de especial interesse são aqueles sulfatados naturalmente ou quimicamente, citados como moléculas eficientes no combate a diversos vírus, além de funcionarem como moléculas terapêuticas ou profiláticas em distúrbios tromboticos (JOHANN et al., 1995; MOURÃO et al., 2001; ALBAN, SCHAUERTE e FRANZ, 2002). As algas marinhas são uma grande fonte de polissacarídeos naturalmente sulfatados (MOURÃO et al., 2001; TALARICO et al., 2004), assim como os líquens são fontes interessantes para a obtenção de moléculas com menor grau de complexidade, sendo portanto, passíveis de sulfatação química. Dentre estas classes de polissacarídeos, destacam-se as galactanas naturalmente sulfatadas de algas marinhas e as glucanas, galactomananas, fucanas e galactanas quimicamente sulfatadas a partir de líquens e fungos. (MARTINICHEN-HERRERO et al., 2005 a, b; CARBONERO et al., 2002; BODE e FRANZ, 1991).

Trabalhos desenvolvidos com plantas também têm apresentado resultados promissores, como nos estudos realizados por EBRINGEROVÁ et al. (1998), NOSAL`OVA et al. (2000) e KARDOSOVÁ et al. (2003) onde estão descritas propriedades antitussígenas atribuídas a polissacarídeos, especialmente às xilanas substituídas. É interessante mencionar que, no estudo realizado por NOSAL`OVA et al. (2000), observou-se uma relação direta entre a presença de ácidos urônicos nos polissacarídeos extraídos de *Rudbeckia fulgida* (bem-me-quer) e o aumento da atividade antitussígena, comprovando a importância da estrutura glicídica neste tipo de atividade biológica. Em um outro estudo, realizado por KARDOSOVÁ et al. (2003), foi demonstrada esta mesma atividade promovida por uma frutofuranana de baixa massa molar, extraída das raízes de *Arctium lappa* (bardana). As frutanas, assim como os oligossacarídeos ricos em frutose, são também citados por promoverem a regulação intestinal em vários níveis (SANZ et al., 2005; LEWIS, BURMEISTER, BRAZIER, 2005).

NOLETO e colaboradores (2002, 2004) caracterizaram a complexação de uma manana de *Saccharomyces cerevisiae* e uma galactomanana de líquen com o íon

vanadilo. Ambos polissacarídeos complexados e não-complexados apresentaram atividade biológica em macrófagos peritoneais de camundongos, sendo a atividade leishmanicida demonstrada pela galactomanana a mais significativa (NOLETO et al., 2002).

Em se tratando de atividades imunológicas e antitumorais, a literatura aponta um grande número de trabalhos envolvendo diversos tipos de polissacarídeos. Tem-se por definição que moléculas capazes de interferir na resposta imunológica de uma célula ou organismo são chamadas de “imunomoduladoras ou modificadoras da resposta biológica” (BMR) (ROSENBERG, 1993; BOHN e BeMILLER, 1995; HAN E McDONALD, 1999; OOI e LIU, 2000). Dentre a ampla variedade de estudos realizados com diversos polissacarídeos de diferentes fontes naturais, especial destaque tem sido dado às glucanas, mananas, galactomananas e arabinogalactanas.

As β -glucanas, isoladas principalmente de bactérias, fungos e plantas são os polissacarídeos mais estudados quanto às atividades imunológicas e antitumorais (STONE e CLARKE, 1992; BOHN e BeMILLER, 1995; WAKSHULL et al., 1999), sendo inclusive descrita a presença de um receptor específico em macrófagos de camundongos (GOLDMAN, 1988), gerando respostas em termos de secreção de interleucinas, NO, O_2^- , H_2O_2 e aumento da capacidade fagocítica (ABEL e CZOP, 1992; SAKURAI, OHNO, YODAMAE, 1992; ADACHI, OHNO e YODAMAE, 1993; OKASAKI et al., 1995, 1996). Atualmente, devido ao consagrado uso popular dos cogumelos comestíveis, ênfase tem sido dado às β -glucanas bioativas isoladas de basidiomicetos, como no *Agaricus blazei* (EBINA e FUJIMIYA, 1998; SHU, LIN e WEN, 2004; DABA e EZERONYE, 2003) ou *Ganoderma lucidum* (SLIVA et al., 2003). As α -glucanas ainda não foram alvo maciço de estudos aprofundados, no entanto, algumas moléculas foram também capazes de gerar respostas positivas sobre macrófagos, células T, *natural killer*, HeLa e Sarcoma 180 como àquelas estudadas por CARNEIRO-LEÃO et al. (1997), MIZUNO et al. (1998) e STUELP-CAMPELO et al. (2002).

O “zymosan”, nome comercial de um extrato da parede celular de leveduras, contém uma mistura de manana e glucana que já demonstrou ser eficiente na indução

do “burst” respiratório em macrófagos (WILLIAMS et al., 1986; BADWAY e KARNOVSKI, 1980; BERTON e GORDON, 1983). Os efeitos de galactomananas e mananas já foram também estudados por PIERARD et al. (1991), INGOLFSDOTTIR et al (1994), RAMESH, YAMAKI e TSUSHIDA (2002) e NOLETO et al. (2002, 2004), sendo observadas alterações na produção de NO e capacidade fagocítica.

2.6.1 Atividades Biológicas de Arabinogalactanas (AGs)

As arabinogalactanas compreendem uma classe promissora de polissacarídeos no que diz respeito a propriedades imunoestimulantes e antitumorais. Estudos atuais têm demonstrado que moléculas obtidas de diferentes fontes, contendo características químicas peculiares de cada espécie, são bioativas quando testadas *in vitro* e *in vivo*. Dentre os muitos estudos realizados, podem ser citados o estímulo *in vitro* da via alternativa do sistema complemento humano quando em contato com uma arabinogalactana (AG) obtida de *Viscum album* (azevinho), de massa molar em torno de 700.000 g.mol⁻¹ (WAGNER e JORDAN, 1998). Uma atividade similar foi observada para uma outra AG, contendo cadeia principal constituída por unidade de β -Galp, ligadas em O-3, isolada e caracterizada a partir das folhas da planta medicinal *Plantago major* L. (tanchagem) (SAMUELSEN et al., 1998). Ainda, ativação no sistema complemento foi observada em AGs extraídas de *Trichilia emetica* (“mahogany”) (DIALLO et al., 2003) e *Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt, conhecida por mahonia (KARDOSOVÁ et al., 2004).

O estudo realizado por CAPEK et al. (2003) demonstrou uma atividade comitogênica¹ para uma AG, uma pectina e uma glucuronoxilana obtidas da sálvia (*Salvia officinalis* L). Neste trabalho, os autores traçam uma relação entre massa molar, estrutura química e atividade biológica destes polissacarídeos, sendo observadas massas molares maiores de 50.000 g.mol⁻¹ para a pectina e a xilana e menor de 10.000 g.mol⁻¹ para a arabinogalactana. Os resultados apresentados

¹ Atividade comitogênica: teste elaborado para avaliar propriedades de glicopeptídeos, sendo usado para outras substâncias imunoestimulatórias. Correlaciona a atividade adjuvante à mitogênese.

demonstraram que a xilana foi o polímero que gerou uma maior atividade quando comparado com os outros.

No estudo realizado por INNGJERDINGEN e colaboradores (2005) foram isolados e caracterizados dois polissacarídeos (arabinogalactana e RGII) a partir da planta medicinal *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC. Ambos apresentaram atividade fixadora do complemento em uma relação dose-dependente e foram capazes de induzir a quimiotaxia de macrófagos, células T e NK. Um estudo semelhante envolvendo AG e pectinas foi realizado por NERGARD e colaboradores (2005), no qual os autores isolaram e demonstraram atividade de polissacarídeos de *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. Ex Walp. (boldo-da-bahia, assapeixe). Na tentativa de traçar uma relação entre estrutura e atividade, os autores submeteram as moléculas à degradação enzimática com arabinofuranosidade e galactanase e observaram um aumento da atividade fixadora do complemento para a fração da AG resistente à degradação.

IM e colaboradores (2005) também estudaram a relação estrutura / atividade promovida por AGs. Neste estudo, os autores extraíram um “pool” de arabinogalactanas com diferentes massas molares do gel da babosa (*Aloe* sp.) e o digeriram parcialmente. O extrato foi desproteinizado e fracionado em colunas de gel permeação. As análises imunológicas foram realizadas em macrófagos e Sarcoma 180. Os resultados apontaram que as AGs com massas molares entre 5 e 400 kDa foram as mais bioativas em ambos os sistemas *in vitro* e *in vitro*.

2.7 MACRÓFAGOS

Os macrófagos são células do grupo dos fagócitos mononucleares, chamados de monócitos no sangue e macrófagos nos tecidos. Estas células são amplamente distribuídas pelo corpo e localizam-se, principalmente, no baço, fígado (células de Kupffer), pulmão (macrófago alveolar), nódulos linfóides e pele (células de Langerhans) (ADAMS, 1979; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

A importância destas células dá-se pela variedade de funções que elas exercem, em que são observadas a defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos, respostas

imunológicas, angiogênicas e hematopoiéticas. As respostas imunológicas (Figura 07) promovidas pelos macrófagos são alvos de estudo de diversos autores e incluem o processamento e apresentação de antígenos, a regulação da resposta de linfócitos T e B por meio de co-ativação, a inflamação, o reparo de tecidos através da secreção de proteases e fatores de crescimento e a atividade citotóxica contra células tumorais e microbianas (WING e REMINGTON, 1980; CAVAILLON, 1994; POPOV et al., 1999; VADIVELLOO et al., 2000; COOK et al., 2001).

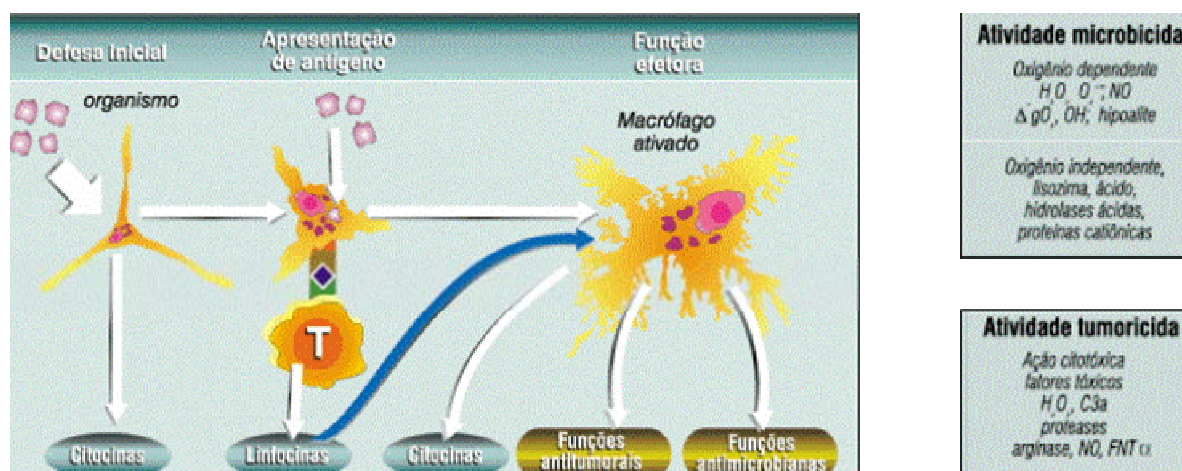


Figura 07 – Papel central dos macrófagos no sistema imunológico.

FONTE: Adaptado de ROITT e RABSON, 2003.

Dependendo do estado funcional dos macrófagos, eles podem ser classificados da seguinte maneira: macrófagos residentes são aqueles derivados da cavidade peritoneal, sem nunca terem sido estimulados; macrófagos elicitados são os recrutados para a cavidade peritoneal como resposta a um agente inflamatório não-específico, como por exemplo, agentes químicos (tioglicolato de sódio); macrófagos ativados são aqueles recrutados para a cavidade peritoneal em resposta a um agente infeccioso (Bacillus Calmette Guerin – BCG), o qual produz um exsudato rico em citocinas (COHN, 1978; CRAWFORD et al., 1987).

A ativação de macrófagos gera um aumento da atividade celular e, como consequência, alterações das características funcionais, bioquímicas e morfológicas destas células, as quais podem ser monitoradas. De maneira geral, os macrófagos ativados apresentam-se maiores e mais aderentes às superfícies, além de expressarem e

secretarem uma maior quantidade de enzimas lisossomais, proteases e fatores de crescimento (KAMINSKI, ROBERTS e GUTHRIE, 1985).

Uma vez ativados, os macrófagos podem então fagocitar bactérias, leveduras e células mortas. No intuito de destruir e eliminar os elementos fagocitados, bem como os invasores, estas células produzem espécies derivadas de oxigênio (“burst respiratório”) e nitrogênio (KARNOVSKI e LAZDINS, 1978; NATHAN, 1985; FADOC et al., 1993; MARCINKIEWICZ, 1997; HALLIWELL e GUTERIDGE, 1999).

A ativação de macrófagos proveniente da ação de polissacarídeos obtidos de vegetais superiores, cogumelos e algas é muito conhecida cientificamente e já foi estudada em centenas de espécies. Compilando dados obtidos de polissacarídeos de espécies vegetais, SCHEPETKIN e QUINN (2006) apontam que tais polímeros atuam no aumento da produção de citocinas e quimiocinas, na proliferação celular e na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como mostra a Figura 08.

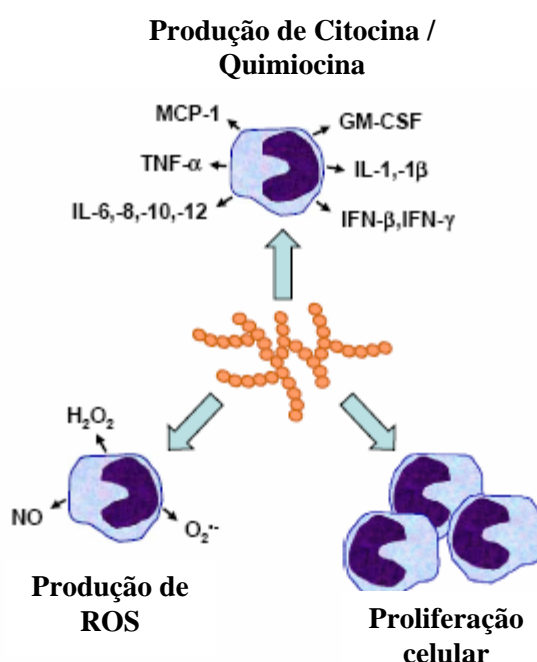


Figura 08 – Diferentes formas de ativação de macrófagos induzidas por polissacarídeos vegetais.

IL: interleucina, IFN: interferon, TNF-α: fator de necrose tumoral α, GM-CSF: fator estimulante de colônia de granulócito e macrófago, MCP-1: proteína quimioatrativa 1 de monócito, NO: óxido nítrico.

FONTE: SCHEPETKIN e QUINN, 2006

Assim, a ativação de macrófagos por meio da ação de polissacarídeos vegetais dá-se, inicialmente, pelo reconhecimento destas macromoléculas por receptores celulares específicos, podendo citar o receptor “Toll like 4” (TLR4), CD14, receptor de complemento 3 (CR3, também conhecido como CD11b/CD18, Mac-1 ou integrina), receptor do tipo “scavenger”, dectina-1 e receptor para manose (SCHEPETKIN e QUINN, 2006; HERRE, GORDON e BROWN, 2004). Os receptores CR3, CDw17, do tipo “scavenger” e dectina-1 parecem estar envolvidos com o reconhecimento de β -glucanas. Ainda, o receptor CR3 também pode reconhecer polissacarídeos ricos em manose ou contendo fucose ou *N*-acetilglicosamina (SCHEPETKIN e QUINN, 2006).

Além de mananas e glucanas, sabe-se também que polissacarídeos pécticos e arabinogalactanas são ativadores de macrófagos, além de já terem sido relatadas propriedades ativadoras anti-complemento e hemapoiéticas (SCHEPETKIN e QUINN, 2006).

Além da capacidade fagocítica, os macrófagos secretam citocinas e quimiocinas, que são proteínas de baixa massa molar, responsáveis pela comunicação entre as células do sistema imune, via receptores específicos da superfície celular (ABBAS, LICHTMAN e POBER, 2000). A secreção destas proteínas é ativada por componentes bacterianos solúveis, como endotoxinas, exotoxinas, enterotoxinas e peptidoglicanas. Um dos agentes indutores da secreção de citocinas é um lipopolissacarídeo endotóxico de bactérias Gram-negativas, o LPS. Esta endotoxina é atualmente utilizada como controle positivo em experimentos que avaliam a ativação de macrófagos via secreção de citocinas, pois baixas concentrações são suficientes para gerar respostas positivas (KOPP e GHOSH, 1995).

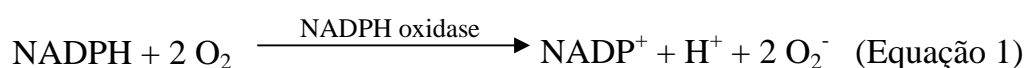
Dentre as citocinas secretadas por macrófagos, encontram-se a interleucina-1 β (IL-1 β) e a interleucina 6 (IL-6), que são moléculas pró-inflamatórias, sintetizadas em resposta às infecções e danos teciduais. Já as interleucinas 10 e 12 (IL-10 e IL-12) são ditas citocinas imunoreguladoras, pois apresentam amplo espectro de atuação em vários tipos de células (ABBAS, LICHTMAN e POBER, 2000).

Além dos macrófagos sintetizarem citocinas eles também são alvos destas moléculas sintetizadas por outras células. Dentre estas moléculas, tem-se o INF- γ , as interleucinas 4 (IL-4) e 12 (IL-12), o fator-beta transformador do crescimento (TGF- β) e o fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF) (ABBAS, LICHTMAN e POBER, 2000).

Além das funções fagocítica e imunológica, os macrófagos ativados desencadeiam o chamado “burst” respiratório e aumentam a produção de NO (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Uma vez que estas respostas bioquímicas foram avaliadas neste trabalho, elas serão abordadas nos itens seguintes.

2.7.1 “BURST” RESPIRATÓRIO

O “burst” respiratório caracteriza-se por um acentuado aumento do consumo de oxigênio celular, gerado pela ativação da reação de redução do oxigênio a ânion superóxido (O_2^-). Esta reação de redução é catalisada pelo complexo NADPH oxidase (Equação 1). Em seguida, o O_2^- é convertido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD) (Equação 2) (KLEBANOFF, 1992; ROTROSEN, 1992).



A NADPH oxidase é constituída por componentes citosólicos e uma flavoproteína ligada à membrana de vesículas secretoras que, sob estímulo, fundem-se à membrana plasmática. A enzima geralmente encontra-se inativa nos fagócitos, no entanto, quando as células são estimuladas por agentes apropriados, como por exemplo, peptídeos microbianos, ocorre a translocação de proteínas fosforiladas para a membrana, onde se associam ao citocromo b558, tornando a enzima ativa e, portanto,

capaz de catalisar a reação de redução do oxigênio (YAMAGUCHI e KANEDA, 1988; JOHANSSON et al., 1995; PARK et al., 1992, PARK e BABIOR, 1992; BABIOR, 1992).

A intensidade do “burst” respiratório será dependente de onde e como os macrófagos serão obtidos. Macrófagos residentes são pouco ativos em relação àqueles obtidos de animais previamente estimulados (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Este estímulo pode ser promovido pelo tratamento dos animais com agentes químicos, como o tioglicolato de sódio, ou biológicos, como o BCG. O éster de forbol 12-meristato 13-acetato (PMA) é também um conhecido ativador da via, e é atualmente usado como controle positivo em experimentos que envolvem a avaliação do “burst” respiratório (JUN, MET e YUAN, 1993).

A formação do O_2^- e H_2O_2 é um processo essencial para a defesa do hospedeiro contra microorganismos invasores, pois estes produtos de reação destroem os patógenos fagocitados ou àqueles presentes no meio extracelular. Outras espécies reativas de oxigênio, como o radical hidroxil ($\bullet OH$) e o singlete de oxigênio (1O_2) são também responsáveis por este mecanismo de defesa à patógenos (JOHNSTON e LEHMEYER, 1997; PICK e KEISARI, 1980; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

2.7.2 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO), um radical livre gasoso e permeável a membranas, é produzido por diferentes tipos celulares, como células do endotélio vascular, neurônio, epitélio do trato respiratório, fibroblasto, hepatócito e macrófago (BILLIAR et al., 1992; NUSSLER e BILLIAR, 1993; SONG et al., 2002). Em macrófagos, a produção de NO encontra-se relacionada com importantes respostas celulares, como na defesa antimicrobiana, inflamação e angiogênese (MacMICKING, XYE e NATHAN, 1997).

A síntese de NO é obtida a partir do átomo de nitrogênio de grupo guanidino do aminoácido L-arginina em uma reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), requerendo ainda, a participação do NADPH e de oxigênio molecular, como mostrado na Figura 09.

A enzima NOS já foi caracterizada a partir de diferentes células, mostrando algumas diferenças estruturais e/ou funcionais (LOWENSTEIN e SNYDER, 1992). Em células endoteliais e neuronais, a NOS, chamada de cNOS é uma enzima constitutiva, dependente de cálcio (BREDT e SNYDER, 1990). Já em macrófagos, a chamada iNOS (óxido nítrico sintase induzível), apresenta-se fortemente complexada a uma molécula de calmodulina, essencial para a permanência da forma ativa da enzima, apresentando ativação transcricional a partir de certas citocinas, LPS (JAMES, 1995), exposição ao IFN- γ e patógenos (GREEN et al., 1990). Em geral, as isoformas de NOS são inibidas por análogos de arginina N-substituídas, como por exemplo, a N^G-monometil-L-arginina (NMMA), aminoguanidina ou N-nitroarginina metil éster (JAMES, 1995).

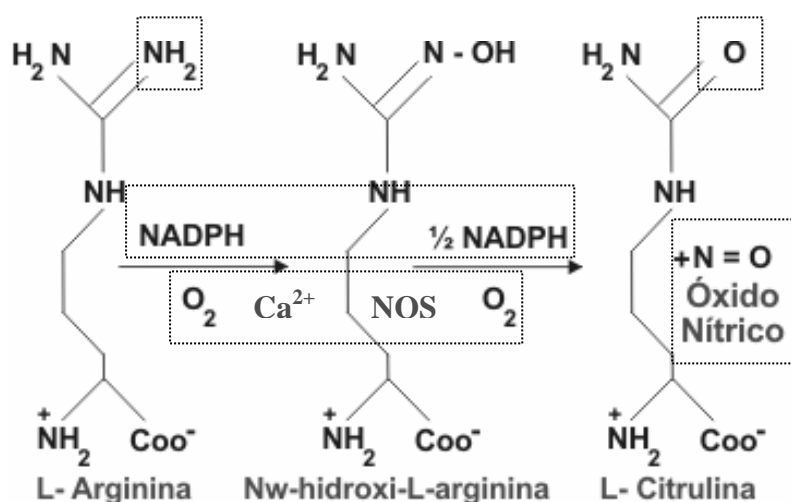


Figura 09 – Reação de formação do óxido nítrico a partir da L-arginina
 FONTE: Adaptado de ROITT e RABSON, 2003.

O NO atua por mecanismo parácrino devido ao curto tempo de meia-vida. Assim, a ação deste efector é evidenciada somente nas células próximas do seu local de síntese. Em soluções aquosas, o NO é rapidamente convertido em nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) (Van der VEEN et al., 2000).

É importante ressaltar que, além das atividades relacionadas ao NO, a síntese descontrolada deste agente pode resultar em uma resposta tóxica, envolvida em

diversas doenças inflamatórias (COTRAN, KUMAR e ROBBINS, 1994; ZHUANG e WOGAN, 1997).

2.8 OS POLISSACARÍDEOS E AS FIBRAS

Acredita-se que o termo “fibras” foi utilizado pela primeira vez por Hipsley, em 1953 (DEVRIES, PROSKY e CHO, 1999), onde o autor descrevia propriedades de constituintes não-digeríveis como a celulose, as hemiceluloses e a lignina. A partir de então, o uso do termo “fibras” foi sendo incorporado na linguagem científica da área. No entanto, a definição de “fibras” sofreu e, ainda sofre, controvérsias, especialmente entre fisiologistas e químicos. De maneira geral, os químicos reconhecem as fibras como sendo “a soma de polissacarídeos não-amiláceos e lignina”, enquanto os fisiologistas adotam o termo para “os componentes alimentares resistentes à degradação por enzimas de mamíferos” (BACH KNUDSEN, 2001). Apesar de ainda não haver um consenso mundial em relação à definição de fibras, em 1981, a AOAC (Associação dos Analistas Químicos Oficiais) reconheceu e adotou a seguinte definição: “Fibras alimentares consistem de polissacarídeos, lignina e substâncias associadas presentes em células vegetais, resistentes à digestão (hidrólise) por enzimas alimentares de humanos”. Nesta definição são incluídas: celulose, hemicelulose, ligninas, gomas, celulosas modificadas, mucilagens, oligossacarídeos e pectinas, além das seguintes substâncias associadas a estas macromoléculas: ceras, cutina e suberina (PROSKY, 1981², citado por DEVRIES, PROSKY e CHO, 1999).

O estudo das fibras é justificado pelas propriedades físico-químicas que estas moléculas desenvolvem no processo fisiológico da digestão, pois sabe-se que as fibras alimentares apresentam capacidade trocadora de cátions, hidratação, viscosidade e absorção de compostos orgânicos (McDOUGALL et al., 1996). A solubilidade das fibras é um fator determinante na função que desempenham: moléculas solúveis em um meio de digestão artificial, preparado com enzimas digestivas em pH controlado,

² PROSKY, L. Discussion on the definition and analysis of fibre. **Association of Official Analytical Chemists: Spring Workshop**. Ottawa

são importantes na regulação da digestão e absorção de nutrientes no intestino delgado. Já as moléculas insolúveis são importantes no intestino grosso, onde aumentam o bolo fecal, diluem a flora microbiana e diminuem o tempo de trânsito boca-ânus (BACH KNUDSEN, 2001).

2.8.1 Digestão de Polissacarídeos

O processo de digestão inicia-se na boca ao se ingerir o alimento, passando pelo estômago, intestino delgado e intestino grosso, sendo completo com a eliminação do bolo fecal através do ânus (Figura 10). Os polissacarídeos, ao serem ingeridos na alimentação, podem ser digeridos, parcialmente digeridos ou não-digeridos na sua totalidade. O amido é um exemplo de molécula integralmente digerida pelo homem, enquanto as pectinas e hemiceluloses são tidas como polissacarídeos parcialmente digeridos e, por fim, a lignina é um exemplo de molécula não digerível pelo homem (BACH KNUDSEN, 2001).

A fase bucal da digestão compreende a mastigação do alimento e a ação da enzima amilase salivar. Nesta curta etapa, o amido é o polissacarídeo alvo do processo digestivo. HOEBLER et al. (1998) demonstraram que, em apenas 27 segundos, 50% do amido de pão é hidrolisado pela enzima.

A fase gástrica da digestão é tida como a chave do processo digestivo, uma vez que esta etapa determina as alterações químicas e mecânicas do alimento, preparando-o para a digestão e absorção (HOEBLER, 2002). O estudo realizado por ZHANG e colaboradores (2003) mostra a relação direta entre o potencial ácido (mimetizando condições gástricas) e a liberação de unidades de arabinose de arabinogalactanas e arabinosilanas degradadas parcialmente neste sistema, mostrando uma diminuição da complexidade da molécula, ou seja, uma alteração química através de um processo químico de digestão.

Já o intestino delgado, dividido em duodeno, jejuno e íleo, é responsável pela digestão enzimática e absorção dos alimentos. Uma vez que as enzimas capazes de digerir polissacarídeos são limitadas à amilase pancreática, a digestão dos

polissacarídeos é restrita (AIRES, 1999). Nesta etapa, as fibras, ou seja, os fragmentos de polissacarídeos não digeridos, reduzem a digestibilidade da matéria seca devido à resistência em serem degradados pelas enzimas endógenas. Segundo BACH KNUDSEN (2001), espera-se que polissacarídeos menos complexos, como as β -glucanas, sejam mais degradadas que outras estruturas mais complexas, para as quais requer-se a cooperação de diversos sistemas enzimáticos. No entanto, estudos realizados por MILLARD e CHESSON (1984) e CANIBE e BACH KNUDSEN (1997) mostraram um alto grau de digestão de pectinas e polissacarídeos pécticos, uma vez que, na porção anterior ao íleo, estes polissacarídeos haviam diminuído as quantidades de ácidos urônicos e galactose. Em geral, as arabinoxilanas encontradas em cereais sofrem uma menor digestão, como mostram os estudos de BACH KNUDSEN e HANSEN (1991), BACH KNUDSEN et al. (1993) e GLITSO et al. (1998).

Por fim, os carboidratos que resistiram ao processo de digestão até o íleo, representam o principal substrato endógeno para a fermentação bacteriana dos microorganismos que habitam o intestino grosso. As regiões de maior atividade bacteriana são o ceco e o colo ascendente, locais onde ocorre uma maior digestão de carboidratos. Em geral, os polissacarídeos não-amiláceos solúveis (fibras solúveis), como os polissacarídeos pécticos, as β -glucanas, as arabinoxilanas, dentre outros são grandemente degradados apenas no intestino grosso (BACH KNUDSEN et al., 1993; GLITSO et al., 1998). Polissacarídeos lignificados são menos digeríveis pela flora bacteriana quando comparados com estruturas não-lignificadas (BACH KNUDSEN, 2001).

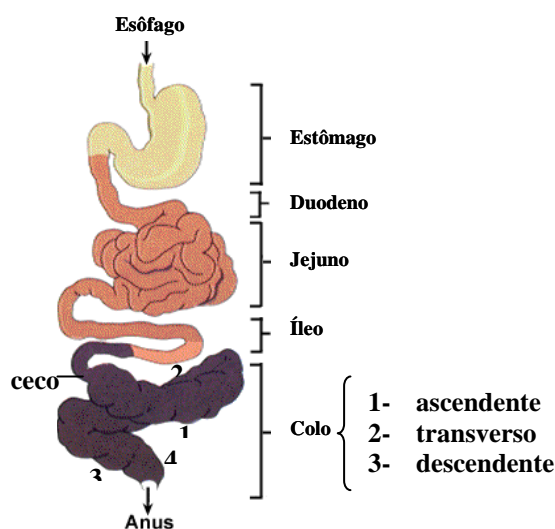


Figura 10 – Visão geral do sistema digestivo.
(UNIVERSITY OF MARYLAND, 2004)

2.9 A PLANTA *Phyllanthus niruri* Linné

As plantas do gênero *Phyllanthus* pertencem a uma das maiores famílias da classe das angiospermas dicotiledônias, as Euforbiáceas, formada por cerca de 230 gêneros e aproximadamente 7500 espécies (JOLY, 1991). O gênero *Phyllanthus* compreende mais de 600 espécies, amplamente distribuídas nos países tropicais e subtropicais (FILHO et al., 1996). A planta *Phyllanthus niruri* (sin. *P. amarus*), popularmente conhecida como quebra-pedra, é uma pequena erva de haste ereta, fina e ramosa, com 10 a 30 cm de altura. As folhas da espécie são ovais e alternadas. Apresenta flores amarelo-esverdeadas e frutos secos (FRANCO, 1997; SANTOS, TORRES e LEONART, 1987) (Figura 11).

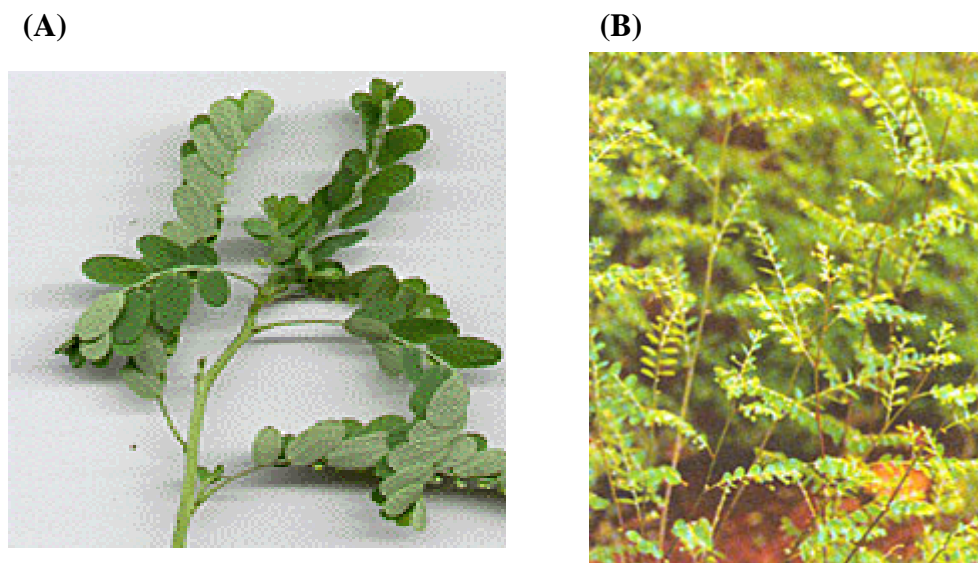


Figura 11- Fotos de (A) Ramo de *Phyllanthus niruri*, (B) *P. niruri* – planta inteira

FONTE: TAYLOR, 2001.

PARELLE e colaboradores³, citados por CHAUHAN, SULTAN e SRIVASTAVA (1977), desenvolveram o primeiro estudo com a planta *Phyllanthus niruri* relatado na literatura. Estes autores caracterizaram um alcalóide de cor branca, denominado norsecurinina. No início dos anos sessenta, foram também caracterizados outros metabólitos secundários, como a filantina e a hipofilantina. Além de alcalóides, outros compostos como taninos, flavonóides, fenóis, triterpenóides, ácidos graxos, ésteres do ácido ftálico, lignanas e vitamina C já foram isolados e caracterizados de diversas espécies do gênero *Phyllanthus* (AHMAD, HUSAIN e OSMAN, 1981; MIGUEL et al., 1996; QUIAN-CUTRONE, 1996; UENO et al., 1998).

Dentre os muitos metabólitos secundários já caracterizados, grande parte apresenta-se associada a carboidratos, sendo a fração glicídica composta, majoritariamente, por mono ou dissacarídeos. Já foram observados glicoflavonóides como as quercetinas (Figura 12-A) e canferol (Figura 12-B) (EL-MEKKAWYN et al., 1995), lignanas glicosiladas denominadas de filantostatina A, 1 e 2 dentre outras (PETTIT e SCHAUFELBERGER, 1988; PETTIT et al., 1990), elagitaninos

³ ROUFFIA, C. R.; ROUFFIA, **Plant Méd. Phytother.**, Toulouse, v.3, p. 220-223, 1969.

glicosilados como a geraniína (Figura 12-C) e furosina (MIGUEL et al., 1996) e a nirurisida (Figura 12-D) (QUIAN-CUTRONE et al., 1996), dentre outros.

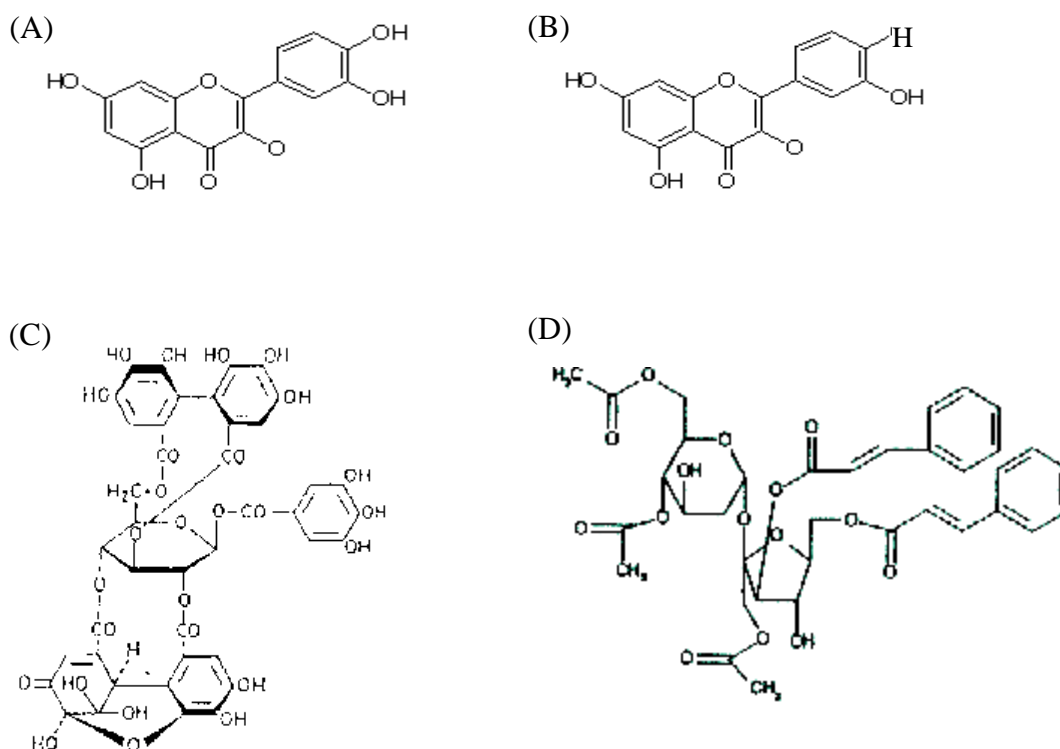


Figura 12 - Exemplos de metabólitos secundários isolados de plantas do gênero *Phyllanthus*. (A) quercetina-3-*O*-β-D-glucosídeo, (B) canferol-3-*O*-β-D-glucosídeo, (C) geraniína e (D) nirurisida.

Atualmente, os estudos químicos de glicosídeos, bem como de outros metabólitos secundários, apresentam-se, em geral, associados a alguma resposta biológica gerada por estes componentes. Uma vez que espécies do gênero *Phyllanthus* são continuamente estudadas por diversos grupos de pesquisa espalhados no mundo, o número de trabalhos científicos envolvendo esta espécie de planta medicinal ultrapassa centenas, e o conhecimento das propriedades medicinais reais apresentados pela planta é extenso.

Dentre as atividades biológicas popularmente consagradas, *P. niruri* já forneceu resultados significativos quanto à inibição do vírus da hepatite B

(VENKATESWARAN, MILLMAN e BLUMBERG, 1987; RAJESHKUMAR e KUTTAN, 2000; JASSIM e NAJI, 2003), aos efeitos hipoglicemiantes, hipotensivo e diurético (DIAS et al., 1995; SRIVIDYA e PERIWAL, 1995; UENO et al., 1988; RAPHAEL, SABU e KUTTAN, 2002) e inibição da formação de cristais de oxalato de cálcio no trato urinário, inibindo o desenvolvimento de cálculos renais (FREITAS, SCHOE e BOIM, 2002). No entanto, outros estudos têm sido realizados na tentativa de se comprovar diversas outras atividades biológicas, tais como a inibição da transcriptase reversa do vírus HIV-1 (OGATA et al., 1992; EL-MEKKAWY et al., 1995; NOTKA, MEIER e WAGNER, 2003), as atividades analgésicas (MIGUEL et al., 1996; SANTOS et al., 1995; SANTOS et al., 2000), antitumoral em células de diferentes linhagens (POWIS e MOORE, 1985; PETTIT e SCHAUFELBERGER, 1988; PETTIT et al., 1990; RAJESHKUMAR e KUTTAN, 2000), antioxidante na prevenção de úlceras gástricas (BANDYOPADHAY, PAKRASHI e PAKRASHI, 2000), anti-inflamatória (IGNÁCIO et al., 2001; KIEMER et al., 2003), antimalárica (MUÑOZ et al., 2000) e na redução dos níveis de lipídeos plasmáticos em ratos (KHANNA, RIZVI e CHANDER, 2002).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é caracterizar estruturalmente polissacarídeos extraídos de *Phyllanthus niruri* Linn, bem como investigar a ativação de macrófagos induzida por estas moléculas e avaliar o comportamento destes polissacarídeos em meio ácido, mimetizando a condição estomacal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Tendo em vista o objetivo geral deste trabalho, os objetivos específicos são:

- Realizar extrações aquosas de *P. niruri*, a fim de obter polissacarídeos;
- Realizar extrações alcalinas de *P. niruri*, a fim de obter polissacarídeos não extraídos com água;
- Isolar e caracterizar estruturalmente esses polissacarídeos;
- Realizar extrações de *P. niruri* nas formas de infuso e decocto, bem como avaliar os polímeros obtidos a partir destas formas de extrações populares;
- Comparar estruturalmente polissacarídeos obtidos nos extratos aquosos com aqueles obtidos nas formas de infuso e decocto;
- Extrair polissacarídeos de diferentes órgãos de *P. niruri* em meio aquoso e alcalino e compará-los;
- Avaliar os efeitos de polissacarídeos de *P. niruri* sobre macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos *in vitro* e *in vivo*;
- Avaliar o comportamento de polissacarídeos em meio ácido, mimetizando condições fisiológicas de digestão estomacal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DO VEGETAL

Os estudos realizados com *P. niruri* foram parcialmente desenvolvidos com material gentilmente cedido pela Indústria Farmacêutica “As Ervas Curam” Ltda. O material doado pertence ao lote 528/02 e consta da forma farmacêutica “ervas *in natura*”, contendo a planta inteira (caule, folhas, raízes, inflorescências) seca e moída.

Os estudos realizados com os órgãos vegetais em separado foram realizados com amostras de *P. niruri* coletadas no bairro Guabirota, na cidade de Curitiba, em 2001. Logo após a coleta, os órgãos vegetais foram separados em raízes, caules e folhas e foram secos em estufa com temperatura menor que 40° C.

A confirmação da espécie vegetal, em ambas as amostras comercial e “*in natura*”, foi gentilmente realizada pela aluna Nathieli Keila Takemori, sob a supervisão da Profa. Dra. Cleusa Bona do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná. Uma amostra da planta está depositada no herbário da UFPR (UPCB), com o número de depósito de 42822.

4.2 EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

4.2.1 Deslipidificação

A deslipidificação do material foi realizada previamente às extrações aquosas, com exceção para a obtenção do infuso e do decocto em que a deslipidificação não foi executada.

O processo foi realizado utilizando-se como solventes o etanol (EtOH), clorofórmio-metanol (CHCl₃-MeOH, 2:1, v/v) e acetona, sequencialmente. As extrações foram realizadas em um sistema de refluxo em banho-maria, mantidos em temperatura de 80° C para as extrações com etanol e clorofórmio-metanol e, 60° C com acetona. Foram realizadas duas extrações de 1,5 h cada, com MeOH e CHCl₃-

MeOH. Com acetona, foi realizada uma extração de 1 h. Todos os extratos foram filtrados e os solventes evaporados à temperatura ambiente. O material deslipidificado seco foi utilizado nos processos de extrações aquosas.

4.2.2 Extrações Aquosas

As plantas medicinais, utilizadas nas formas de chás, podem ser preparadas por infusão ou decocção. Os infusos devem ser a preparação de escolha para folhas, flores, inflorescências, sementes e frutos. Já os decoctos são ideais no preparo para raízes, rizomas, caules, estigmas e cascas (SANTOS, TORRES e LEONART, 1987; CHATONET, 1983).

Neste trabalho, foram realizados 4 procedimentos diferenciados de extrações aquosas, como segue:

4.2.2.1 Infusão

O chá na forma de infuso foi preparado a partir de 200 g de *P. niruri* levemente moída, obtida comercialmente. Três litros de água fervente foram vertidos sobre a planta, o recipiente foi fechado e a extração ocorreu até que o extrato atingisse temperatura ambiente (~6 h). O extrato foi filtrado, o volume reduzido em evaporador rotatório e liofilizado.

4.2.2.2 Decocção

O chá na forma de decocto foi preparado a partir de 200 g de *P. niruri* levemente moída, obtida comercialmente. Três litros de água foram vertidos sobre a planta e a extração ocorreu a 100° C, sob refluxo por 15 min. Após fervura, o extrato foi filtrado à quente, o volume reduzido em evaporador rotatório e liofilizado.

4.2.2.3 Extração aquosa exaustiva

Uma amostragem da planta seca e moída (1 kg) foi submetida à extração aquosa exaustiva, com prévia deslipidificação como consta no item 4.2.1.

O material residual proveniente da deslipidificação foi submetido a extrações aquosas sequenciadas (cada 100g da planta foi adicionado de 3 L de água por extração), sob refluxo, à temperatura de 100 °C. O período de extração foi determinado até exaustão completa de carboidratos, avaliada pelo método do fenol-ácido sulfúrico (item 4.4.2.1), sendo necessárias um total de 60 h de extração. Após cada extração (6 h), o material foi filtrado, o volume concentrado em evaporador rotatório e submetido à precipitação com etanol separadamente, sendo que foram utilizados três volumes de etanol para um de amostra. O material foi então centrifugado e o precipitado (polissacarídeos) dialisado contra água corrente, em membrana de 12 kDa, por 24 h. O sobrenadante etanólico (oligossacarídeos), bem como o precipitado ressuspensão em água e dialisado foram concentrados em evaporadores rotatórios e liofilizados para posteriores análises e purificação.

4.2.2.4 Extração aquosa dos órgãos vegetais

Cada órgão vegetal liofilizado (raízes = 13,4 g; caules = 41,4 g; folhas = 19,9 g) foi submetido à extração aquosa, com prévia deslipidificação como consta no item 4.2.1. Foram realizadas 2 extrações sequenciais sob refluxo, de 6 h cada. Após cada extração, o material foi filtrado à quente e os extratos combinados. O extrato total foi, em seguida, precipitado com 3 volumes de EtOH para cada volume de amostra. O material foi então centrifugado e o precipitado (polissacarídeos) dialisado contra água corrente por 24 h. O sobrenadante etanólico (oligossacarídeos), bem como o precipitado ressuspensão em água e dialisado foram concentrados em evaporadores rotatórios e liofilizados para posteriores análises e purificação.

4.2.3 Extrações Alcalinas

As extrações alcalinas foram realizadas com a planta inteira e com os órgãos vegetais em separado, como segue:

4.2.3.1 Extrações alcalinas da planta inteira

O material residual do extrato aquoso deslipidificado foi submetido a extrações alcalinas sequenciais, fazendo-se uso de solução aquosa de KOH 2% (1,5 h, 3x). As extrações foram realizadas sob refluxo, a 100 °C, tendo sido adicionado à primeira extração NaBH_4 a fim de evitar a degradação do polímero através do processo de hidrólise alcalina redutiva. Os extratos foram filtrados ainda a quente, neutralizados com HOAc glacial e dialisados contra água corrente por 48 h. Os volumes de água dos extratos foram reduzidos em evaporador rotatório e os extratos, liofilizados.

4.2.3.2 Extrações alcalinas dos órgãos vegetais

Os materiais residuais dos extratos aquosos deslipidificados das raízes, caules e folhas foram submetidos a extrações alcalinas sequenciais, fazendo-se uso de soluções aquosas de KOH 2% (1,5 h, 3x) e NaOH 15% (1 h, 2x). As extrações foram realizadas sob refluxo, a 100 °C, tendo sido adicionado à primeira extração NaBH_4 a fim de evitar a degradação do polímero através do processo de hidrólise alcalina redutiva. Os extratos foram filtrados ainda a quente, neutralizados com HOAc e dialisados contra água corrente por 48 h. Após redução do volume do extrato em evaporador rotatório, os extratos foram liofilizados.

4.3 PURIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos obtidos a partir das extrações aquosas e alcalinas foram submetidos a diversos processos de purificação, descritos a seguir. A purificação destas moléculas foi acompanhada por análises de homogeneidade (HPSEC-MALLS), espectroscopia (RMN) e espectrometria de massa (GC-MS).

4.3.1 Congelamento e Descongelo

A técnica de congelamento e descongelamento consiste em solubilizar as frações polissacarídicas em água destilada e, a seguir, submetê-las ao processo de congelamento e posterior descongelamento à temperatura ambiente. O precipitado insolúvel em água fria foi separado dos demais componentes solúveis por centrifugação (9000 rpm, 15 min). Esse processo de purificação foi repetido diversas vezes até que não houvesse formação de precipitado no sobrenadante. Os sobrenadantes foram reunidos, bem como os precipitados. (GORIN e IACOMINI, 1984).

4.3.2 Precipitação com Solução de Fehling

As frações geradas por congelamento e descongelamento, advindas das extrações alcalinas, foram submetidas à purificação pela precipitação com solução de Fehling (JONES e STOODLEY, 1965). A solução de Fehling é composta por duas soluções preparadas e armazenadas separadamente. A solução A é composta por tartarato de potássio e sódio e KOH (173 g + 125 g + H₂O q.s.p. 500 mL, respectivamente), enquanto a B consiste de sulfato de cobre 5.H₂O (55,7 g + H₂O q.s.p. 500 mL).

As frações sobrenadantes do congelamento e descongelamento foram solubilizadas em um mínimo volume de água. A esta amostra solúvel, foi adicionado o mesmo volume de solução de Fehling, sendo metade do volume proveniente da

solução A e metade da B. Após vigorosa agitação manual, o material foi mantido sob refrigeração por 12 h.

Em seguida, os precipitados formados foram separados por centrifugação (9000 rpm, 15 min). As novas frações obtidas (precipitado e sobrenadante) foram neutralizadas com HOAc e dialisadas contra água corrente, em membrana de 12 kDa, por 48 h. Os materiais dialisados foram submetidos ao tratamento com resina Dowex na forma catiônica, novamente dialisados (24 h), concentrados sob pressão reduzida e liofilizados.

As frações insolúveis em água fria, obtidas no congelamento e descongelamento, foram solubilizadas diretamente na solução A de Fehling. Após solubilização, igual volume da solução B foi adicionado. Os processos de fracionamento e descomplexação foram idênticos ao realizado para a fração solúvel em água fria, descrito acima.

4.3.3 Diálise em Membranas

As frações que apresentaram perfil heterogêneo após os passos anteriores de purificação foram submetidas à diálise em membranas de diálise com limite de exclusão de 16 kDa. As diálises foram realizadas em sistema fechado contra água destilada (1 g de amostra em 4 L de água destilada), sob agitação magnética e em temperatura ambiente. A troca de água foi realizada diariamente. O processo foi interrompido quando a água de diálise apresentou reação negativa para carboidratos por meio do método de fenol-ácido sulfúrico (item 4.4.2.1) (CARBONERO et al., 2005). O material eluído pela membrana teve o volume concentrado em evaporador rotatório e foi liofilizado, assim como o material retido.

4.3.4 Ultrafiltração

As frações que apresentaram perfil heterogêneo após a diálise em membrana foram submetidas à ultrafiltração em membranas de celulose regenerada ou

polietersulfona com limite de exclusão de 10 e/ou 30 kDa. As ultrafiltrações foram realizadas por um sistema de filtração adequado (modelo 16249, Sartorius) acoplado a um cilindro de ar comprimido (CARBONERO et al., 2005).

4.4 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS

4.4.1 Métodos Químicos

4.4.1.1 Hidrólise ácida total, redução e acetilação

A hidrólise ácida total dos polissacarídeos foi realizada utilizando-se cerca de 2 mg da amostra diluídas em 1,0 mL de TFA 1 mol.L⁻¹, a 100 °C, por 8 h. Após a hidrólise, o ácido foi eliminado das amostras através de evaporação em temperatura ambiente até seca.

Os produtos de hidrólise foram ressuspensos em 1,0 mL de água destilada e reduzidos com NaBH₄ em temperatura ambiente, pH 10, por 12 h. Após este período, as frações foram neutralizadas com ácido acético glacial e a solução foi levada à seca sob pressão reduzida. O ácido bórico formado foi co-evaporado por meio de sucessivas lavagens com metanol, na forma de borato de trimetila (WOLFROM e THOMPSON, 1963a).

Os alditóis formados durante o processo de redução foram então acetilados com uma mistura de anidrido acético e piridina (1:1, v/v) por 12 h a temperatura ambiente (WOLFROM e THOMPSON, 1963b). A acetilação foi interrompida por adição de gelo, e os acetatos de alditóis foram extraídos com clorofórmio. A piridina residual presente na fração clorofórmica foi removida por meio de sucessivas lavagens com solução de CuSO₄ a 5%. Os acetatos de alditóis foram analisados por GC-MS.

4.4.1.2 Análise de metilação

As metilações foram realizadas de acordo com o método descrito por CIUCANU e KEREK (1984). As amostras (5 mg) foram solubilizadas em DMSO, tendo sido então, adicionado NaOH pulverizado e seco, até concentração saturante. O sistema foi agitado vigorosamente em agitador do tipo VORTEX por 15 minutos. Em seguida, foram feitas adições sequenciais de CH_3I até que fosse atingida a proporção CH_3I :carboidrato (50:1). Entre cada adição do agente metilante, as amostras foram agitadas vigorosamente por 15 minutos. O material foi deixado em repouso por 24 h e a reação foi interrompida com água gelada e neutralizada com HOAc. As amostras foram então dialisadas contra água corrente, em membranas de 12 kDa, por 48 h e liofilizadas.

4.4.1.3 Metanólise

Os polissacarídeos metilados foram submetidos à metanólise com MeOH:HCl saturante (~3,0%, v/v), em estufa a 80°C, por 2 h. A neutralização foi realizada com carbonato de prata (Ag_2CO_3) e a amostra foi filtrada e evaporada. O material metanolisado foi hidrolisado conforme descrito a seguir.

4.4.1.4 Hidrólise para formar os derivados parcialmente *O*-metilados

A hidrólise ácida total dos polissacarídeos metilados e metanolisados foi realizada com H_2SO_4 0,5 mol.L⁻¹, por 16 h, a 100 °C. O ácido foi neutralizado com carbonato de bário (BaCO_3) e as amostras foram reduzidas com NaBH_4 ou NaBD_4 , sendo acetiladas com anidrido acético:piridina (1:1, v/v), à temperatura ambiente por 12 h. Os acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados foram analisados por GC-MS (SASSAKI et al., 2005).

Os polissacarídeos parcialmente metilados que não foram submetidos à metanólise, foram hidrolisados com H_2SO_4 50% (v/v; 0,5 mL) por 1 h a 0 °C, seguido

por diluição até 5,5% (v/v; adição de 4,0 mL de água destilada) o qual foi mantido a 100 °C por 14-18 h, seguido de neutralização com BaCO₃ (SAEMAN et al., 1954).

4.4.1.5 Carboxi-redução dos polissacarídeos ácidos

O processo de carboxi-redução foi realizado segundo TAYLOR e CONRAD (1972), sendo o polissacarídeo dissolvido em tampão MES [ácido 2-(*N*-morfolina)-etanosulfônico] (0,2 mol.L⁻¹, pH 4,75). Ao polissacarídeo em solução foi adicionado, pouco a pouco e sob agitação, carbodiimida [ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)carbodiimida]. A quantidade de carbodiimida utilizada foi de 24 mg para cada 1 mg de ácido urônico contido na amostra. A reação procedeu por 2 h, sob agitação branda. O pH foi posteriormente ajustado para 7,0 pela adição de tampão TRIS/HCl (2 mol.L⁻¹, pH 7,0). A redução ocorreu com a adição de NaBH₄, até uma concentração final de 2 mol.L⁻¹. A reação foi mantida por 12 h e neutralizada com HOAc até pH 5,0. Finalmente, o material foi dialisado contra água corrente por 48 h, concentrado e liofilizado. O polissacarídeo carboxi-reduzido foi analisado em GC-MS. Foi realizada dosagem de ácidos urônicos (item 4.4.2.2) para confirmação da eficácia da reação.

4.4.2 Métodos Espectrofotométricos

4.4.2.1 Dosagem de açúcar total

As dosagens de carboidratos totais foram realizadas pelo método do fenol-ácido sulfúrico, o qual apresenta sensibilidade de 8 a 70 µg de açúcar (DUBOIS et al., 1956). O complexo colorido, resultante da reação do hidroximetilfurfural com fenol, foi lido a 490 nm, usando como padrões D-xilose; L-arabinose, D-glucose e/ou D-galactose a 50µg.mL⁻¹, dependendo dos monossacarídeos majoritários da fração. As análises foram realizadas utilizando 0,5 mL de amostra solubilizada em água destilada 0,5 mL de fenol 5% (p/v) em 2,5 mL de H₂SO₄.

4.4.2.2 Dosagem de ácidos urônicos

Foi utilizado o método do sulfamato-metahidroxibifenila, o qual apresenta sensibilidade de 0,97 a 38,8 μg de ácido urônico, conforme descrito por FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991). As amostras insolúveis em água fria foram previamente hidrolisadas com TFA 2 mol.L^{-1} , por 8 h, a 100°C e neutralizadas com NaOH 2 mol.L^{-1} . As dosagens foram realizadas com as amostras neutralizadas.

As amostras solúveis ou previamente hidrolisadas foram solubilizadas (0,4 mL) em solução de ácido sulfâmico-sulfamato de potássio (40 μL , 4 mol.L^{-1} , pH 1,6), seguido da adição de 2,4 mL de tetraborato de sódio (75 mol.L^{-1}) em ácido sulfúrico concentrado. O material foi aquecido durante 20 minutos, a 100 °C, resfriado em banho de gelo e adicionado de 80 μL de *m*-hidroxibifenila, gerando o aparecimento de um complexo colorido, lido em 525 nm. A curva padrão foi realizada com ácido glucurônico.

4.4.2.3 Dosagem de proteínas

As frações polissacarídicas foram investigadas quanto ao teor de proteínas e, eventualmente, de grupamentos fenólicos pela associação de dois métodos: HARTREE (1972) e PETERSON (1977), conforme descrito por BOCHICCHIO, GANTER e REICHER, 2000. Associando-se à metodologia de HARTREE (1972), que dosa proteínas e grupamentos fenólicos, foi realizada a etapa de precipitação de proteínas, descrita por PETERSON (1977), visando minimizar as interferências de fenólicos na dosagem de proteínas. Assim, o método de PETERSON (1977), é capaz de dosar somente grupamentos protéicos e a quantidade de fenólicos é obtida pela diferença das duas dosagens.

A determinação do conteúdo protéico obtido a partir das células utilizadas nos experimentos biológicos foi realizada com o reagente Coomassie Blue Brilhante G-250, segundo o processo descrito por BRADFORD (1976), o qual apresenta sensibilidade de 1 a 100 μg de proteína. As leituras foram realizadas a 595 nm.

Para ambas as metodologias o padrão utilizado para a construção da curva padrão foi a proteína soro albumina bovina (BSA).

4.4.3 Métodos Cromatográficos

4.4.3.1 Cromatografia de partição em papel (PC)

Análises qualitativas dos monossacarídeos foram realizadas por meio de cromatografia em papel Whatman nº1, sendo a corrida descendente com o sistema de solvente *n*-butanol:piridina:água (5:3:3, v/v) (HOUGH e JONES, 1962). A revelação dos cromatogramas foi realizada com nitrato de prata alcalino: AgNO₃ saturado em acetona 1:1000 v/v, seguido de NaOH 40% em etanol – 1:250 v/v e, por fim, clareamento do papel com solução de tiosulfato de sódio 5% v/v, seguido de enxágüe em água destilada (TREVELYAN, PROCTER e HARRISON, 1950).

4.4.3.2 Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)

Os monossacarídeos derivatizados a acetatos de alditóis e acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados foram quantificados por cromatografia líquido gasosa acoplada a espectrometria de massa. O cromatógrafo utilizado foi da marca VARIAN, modelo 3300, acoplado a um espectrômetro de massa FINNIGAN MAT, modelo ITD 800. Foram utilizadas as colunas DB-225 (30 m x 0,25 mm d.i.) e/ou DB-210. A temperatura de injeção da amostra foi de 50 °C, programada para aumentar 40 °C.min⁻¹ até atingir a temperatura constante de 220 °C (acetatos de alditóis) ou 215 °C (acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados). Hélio ultra puro foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 1,0 ml.min⁻¹.

4.4.3.3 Cromatografia de exclusão estérica acoplada a multidetectores (HPSEC-MALLS)

As análises em HPSEC-MALLS foram realizadas com o intuito de observar o grau de homogeneidade e a massa molar ponderal média dos polissacarídeos purificados. Foi utilizado um cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS equipado com detector de índice de refração diferencial (modelo WATERS 2410) e espalhamento de luz em multiângulos (WYATT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP-F). Foram também utilizadas 4 colunas de gel permeação em série, com limite de exclusão de 1×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 Da.

As amostras foram solubilizadas em água Milli Q ou em uma solução de nitrito de sódio (NaNO_2) $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, contendo 200 ppm de azida de sódio (NaN_3). A concentração final das amostras foi de 1 mg.mL^{-1} . Previamente à injeção das amostras, estas foram filtradas em membranas de acetato de celulose com porosidade de $0,22 \mu\text{m}$. O eluente utilizado nas análises foi o NaNO_2 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ em NaN_3 $0,2 \text{ g.L}^{-1}$, com fluxo de $0,6 \text{ mL.min}^{-1}$.

A taxa de variação do índice de refração em relação à concentração (dn/dc) foi determinada para as amostras com perfil homogêneo, com o intuito de determinar a massa molar destas. Para tanto, foi preparada uma solução mãe na concentração de 1 mg.mL^{-1} (em NaNO_2 contendo NaN_3), que foi filtrada em membrana com porosidade de $0,22 \mu\text{m}$ e diluída nas concentrações de 0,2, 0,4, 0,6 e $0,8 \text{ mg.mL}^{-1}$.

4.4.4 Análises Espectroscópicas

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) compreendem análises de carbono 13 (^{13}C) e DEPT (*Distortionless enhancement by polarization transfer*) e foram obtidos pelo uso do espectrômetro BRUKER, modelo AVANCE-DRX-400 ou AvanceTM 500 (Istituto di Ricerche Chimiche e Biochimiche “Giuliana Ronzoni, Milão, Itália).

As análises foram realizadas a 50 °C e as amostras solubilizadas em óxido de deutério (D₂O) ou dimetilsulfóxido deuterado (Me₂SO-*d*₆). Os deslocamentos químicos foram expressos em δ (ppm) relativos aos sinais de ¹³C de acetona em δ 30.20 ou de Me₂SO-*d*₆ em δ 39.70.

4.5 EXPERIMENTOS BIOLÓGICOS

Os experimentos biológicos realizados neste trabalho foram desenvolvidos no Laboratório de Oxidações Biológicas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular desta Universidade, sob a orientação da Dr^a. Guilhermina Rodrigues Noleto, com a supervisão da Prof^a. Dr^a. Maria Benigna Martinelli de Oliveira.

4.5.1 Animais

Os experimentos biológicos foram realizados utilizando-se camundongos albinos machos Swiss (*Mus musculus*), com aproximadamente 2 meses de idade, pesando entre 25-30 g. Os animais foram mantidos no Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, submetidos a um fotoperíodo de 12 h e receberam ração Purina® e água *ad libidum*. Os procedimentos utilizados na manipulação destes animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, com o projeto intitulado “Efeito de galactomananas de diferentes fontes e seus complexos com vanádio (V^{IV}; V^V) sobre macrófagos peritoneais de camundongos e *Leishmania amazonensis* in vitro”, o qual apresenta a Dra. Guilhermina Rodrigues Noleto como responsável (Anexo 1).

4.5.2 Obtenção de Macrófagos Peritoneais

Os macrófagos peritoneais dos camundongos foram obtidos após a morte destes por asfixia em câmara de vidro, contendo algodão embebido em éter etílico. Após assepsia local com álcool iodado e exposição do peritônio, foram inoculados 6,0 mL

de PBS estéril a 25 °C. A cavidade peritoneal foi vigorosamente massageada e as células aspiradas e acondicionadas em tubos plásticos estéreis, mantidos em gelo. As células foram centrifugadas (14000 rpm por 10 min) e o “pellet” ressuspense em meio MEM. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer em microscópio Olympus e o volume da suspensão ajustado para a concentração de células de 5×10^6 células.mL⁻¹.

As células (100µL) foram então aplicadas em placas de 96 poços, onde ficaram incubadas a 37 °C, sob atmosfera de 5% de CO₂, por 1 h para que ocorresse a adesão celular. A monocamada de células aderidas foi lavada uma vez com PBS para remoção das células não aderentes (SASADA, PABT & JOHNSTON, 1983). Este procedimento foi realizado para todos os experimentos nos quais se fez uso de macrófagos.

4.5.3 Soluções e Meios Utilizados nos Experimentos com Macrófagos

4.5.3.1 Solução salina tamponada

A solução salina tamponada (PBS) em pH 7,4, foi preparada na forma de solução estoque cinco vezes concentrada, sendo constituída nestas condições de: Na₂PO₄ 40,5 mmoles/l, NaCl 680 mmoles/l, KH₂PO₄ 7,3 mmoles/l. Esta solução foi esterilizada em autoclave a 120° C, 1 atm de pressão, por trinta minutos, e mantida a 4°C. No momento do uso, fez-se a diluição em água bidestilada estéril.

4.5.3.2 Solução salina balanceada de Hanks (HBSS)

A solução salina balanceada de Hanks (HBSS) (HANKS & WALLACE, 1949), resulta da mistura de duas soluções A e B, que foram preparadas na forma de soluções estoque vinte vezes concentradas. Nestas condições a solução A era assim constituída: NaCl 2,737 moles/l, KCl 104 mmoles/l, CaCl₂ 19,7 mmoles/l, MgSO₄.7H₂O 16,2 mmoles/l; a solução B apresentava a seguinte composição: Na₂HPO₄ 8,4 mmoles/l,

KH_2PO_4 8,7 mmoles/l, glucose 100 mmoles/l. As duas soluções foram misturadas e diluídas com água milliQ ou bidestilada. O pH foi então ajustado para 7,4 e a solução resultante foi esterilizada por filtração.

4.5.3.3 Meio mínimo essencial (MEM)

O meio MEM (EAGLE, 1959), foi reconstituído em água milliQ, esterilizado por filtração e mantido a 4°C. A este meio foi adicionado solução de HEPES estéril, na concentração final de 10 mmol/l e o pH ajustado a 7,4 com solução estéril de bicarbonato de sódio a 7,5%. Quando necessário o meio foi suplementado como soro fetal bovino, a 5% para os macrófagos. Os antibióticos penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml) e gentamicina (50 µg/ml), foram também utilizados.

4.5.4 Experimentos *in vitro* com Macrófagos Peritoneais de Camundongos

As amostras (polissacarídeos e derivados) utilizadas na realização dos experimentos biológicos foram esterilizadas por ultrafiltração em membrana com limite de exclusão de 30 kDa ou submetidas à autoclavagem.

4.5.4.1 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade das células foi determinada pelo método do MTT (brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio), de acordo com o descrito por REILLY et al. (1998). Segundo esta metodologia, as células viáveis e metabolicamente ativas reduzem o sal tetrazólio, formando cristais roxos de formazan, solúveis em DMSO.

Neste experimento, as células previamente aderidas em placas de cultura foram incubadas com diferentes concentrações do polissacarídeo (25-250 µg.mL⁻¹) por 2, 24 e 48 h a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ em 180 µL de HBSS adicionado de 20 µL de solução de MTT a 5 mg.mL⁻¹. A concentração final de MTT foi de 500

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ Após o tempo de reação de 2 h, o excesso de MTT foi removido e os cristais formados, dissolvidos em DMSO. A leitura de absorbância foi realizada em 550 nm, em leitor de microplacas BIO-RAD modelo Benchmark, utilizando-se DMSO como branco (REILLY et al., 1998).

4.5.4.2 Determinação da produção de ânion superóxido

Os macrófagos previamente aderidos foram incubados em um meio de reação padrão contendo HBSS e ferricitocromo C ($80 \mu\text{mol.L}^{-1}$) na presença ou ausência de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do PMA (phorbol 12-miristato 13-acetato) como controle positivo. O polissacarídeo foi adicionado ao grupo tratado em diferentes concentrações ($25\text{-}250 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A produção celular de ânion superóxido corresponde à concentração de citocromo c reduzido. Esta foi determinada utilizando o Coeficiente de Extinção Molar para a mistura $C_{\text{oxid.red.}} \Delta\epsilon = 2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (SASADA, PABT & JOHNSTON, 1983). Os resultados foram expressos por nmol.mg^{-1} de proteína celular. A leitura foi realizada em 550 nm, em leitor de microplacas.

4.5.4.3 Determinação da produção de óxido nítrico

Os macrófagos previamente aderidos foram incubados na presença ou ausência de IFN- γ (26 U.mL^{-1}) e LPS (50 ng.mL^{-1}) adicionado de IFN- γ (26 U.mL^{-1}) como controles. O grupo tratado foi adicionado do polissacarídeo em diferentes concentrações ($5\text{-}50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ou $25\text{-}250 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A produção celular de óxido nítrico foi mensurada após 48 h de incubação, por meio da reação de Griess, sendo a concentração de nitrito determinada através de uma curva padrão de NaNO_2 (GREEN et al., 1982).

O controle de uma eventual contaminação do polissacarídeo com LPS foi realizado através do tratamento do polissacarídeo com polimixina B por 1 h antes do uso (CUNHA et al., 1993), uma vez que a polimixina é um antibiótico natural capaz de neutralizar a ação do LPS.

4.5.5 Avaliação da Atividade Elicitora *in vivo* de Células

A atividade elicitora de células também foi realizada com camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), fazendo uso de 4 animais por grupo. Os animais do grupo controle receberam PBS, enquanto os animais tratados receberam uma dose de 50, 100 ou 200 mg.mL⁻¹ do polissacarídeo, intraperitonealmente. Após 24 h, os animais foram sacrificados e as células do exsudato peritoneal foram obtidas como descrito no item 4.5.2 (página 47).

4.5.6 Análises Estatísticas

Todos os experimentos com macrófagos peritoneais de camundongos foram submetidos ao tratamento estatístico através da análise de variância ANOVA. Para avaliar as diferenças entre os tratamentos e o controle foi utilizado o teste de Tukey, que permite estabelecer a diferença mínima significativa entre duas médias.

4.7 COMPORTAMENTO POLISSACARÍDICO EM CONDIÇÃO FISIOLÓGICA GÁSTRICA

Esta etapa deste trabalho compreende a avaliação química e biológica do polissacarídeo previamente caracterizado.

4.7.1 Voluntários

Foram selecionados 2 voluntários, 1 homem e 1 mulher, com idade entre 20 e 30 anos que se submeteram ao processo de endoscopia e apresentaram um perfil endoscópico normal. Os voluntários consentiram, de forma escrita, com a participação na pesquisa, conforme consta no Anexo 3 (Declaração de Consentimento Livre e Esclarecido). O processo de obtenção do suco gástrico foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital do Trabalhador (Anexo 2).

4.7.2 Obtenção do Suco Gástrico

4.7.2.1 Endoscopia

As endoscopias do trato gastrointestinal superior foram realizadas no Hospital do Trabalhador, sob a responsabilidade do Dr. Alfreli Arruda Amaral, médico gastroenterologista desse hospital. O procedimento foi realizado como de costume e exigiu jejum alimentar prévio de 12 h e abstinência de água por 6 h.

Os voluntários foram anestesiados localmente com lidocaína e receberam uma solução com dimeticona para diminuição da formação de gases.

4.7.2.2 Coleta e armazenamento do suco gástrico

O suco gástrico de cada voluntário foi aspirado separadamente via canal de sucção, previamente lavado com NH_4OH , seguido de EtOH 70% e acondicionado em frascos de vidro, previamente esterilizados.

Precedente à coleta, um dos voluntários foi submetido à alimentação fantasma (descrito no item 5.3) para indução da liberação do suco gástrico na fase de interdigestão. Para tanto, esse voluntário sentiu o odor de alimentos antes da endoscopia.

Após a coleta, o material foi imediatamente armazenado a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ até sua utilização (LINDAHL et al., 1997). O material colhido foi medido quanto ao volume e pH.

4.7.3 Análise Estrutural *in vitro* de Carboidratos em Condição Fisiológica Gástrica

4.7.3.1 Hidrólise ácida de polissacarídeos em condição fisiológica gástrica

Polissacarídeos (2,0 mg) previamente extraídos, purificados e caracterizados foram submetidos à hidrólise ácida com HCl pH 2,0 ou suco gástrico (1,0 mL). As hidrólises foram conduzidas por 3 h, $37\text{ }^\circ\text{C}$ com amostragem colhidas a cada 15 min até um tempo total de 120 min e mais uma coleta em 180 min. As amostras foram

congeladas e liofilizadas diversas vezes a fim de eliminar o ácido utilizado. Os produtos gerados foram analisados por HPLC e parte deles, fracionados como segue com o intuito de analisar as alterações moleculares que o processo de hidrólise gerou.

4.7.3.2 Fracionamento dos produtos da hidrólise ácida

Após hidrólise, parte dos produtos gerados foi também fracionado de acordo com a massa molar, em que foram adicionados 3 v de EtOH, seguido de resfriamento, centrifugação, evaporação do solvente sob pressão reduzida e liofilização. As subfrações originadas apresentavam compostos de alta e baixa massa molar, separadamente. Estas subfrações foram submetidas às análises químicas e biológicas.

4.7.3.3 Análises espectrométricas e espectroscópicas

As composições monossacarídicas, análises de metilação e RMN foram realizadas conforme itens anteriores.

4.7.3.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As análises de HPLC foram realizadas em aparelho SHIMADZU com detector de índice de refração (RID 10A, SHIMADZU). Foi utilizada uma coluna para ácidos orgânicos (HPX-87H, 300 x 780 mm – AMINEX ion exclusion – BIO RAD) e as análises foram realizadas a 65 °C. A fase móvel consistiu de uma solução degaseificada de ácido sulfúrico 8 mmol.L⁻¹ em água ultrapura Milli Q. O fluxo utilizado foi de 0,6 mL.min⁻¹.

As amostras foram solubilizadas em água Milli Q a uma concentração de 1 mg.mL⁻¹ e filtradas em membrana de acetato de celulose com porosidade de 0,22 µm. O volume de injeção de amostra foi de 50 µL e foram utilizados padrões de monossacarídeos (Rha, Fuc, Ara, Xyl, Man, Gal, Glc, GalA e GlcA) para comparação dos tempos de retenção dos picos.

4.7.3.5 Experimentos biológicos

Os experimentos biológicos desenvolvidos com as frações degradadas foram realizados conforme itens anteriores, em macrófagos peritoneais de camundongos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o intuito de facilitar a leitura e interpretação dos resultados obtidos neste trabalho, o item “resultados e discussão” encontra-se apresentado da seguinte maneira: (1) análises químicas de polissacarídeos, em que serão abordados a extração, purificação e caracterização química destas macromoléculas; (2) atividade biológica de polissacarídeos, em que será apontada a resposta biológica destas moléculas em macrófagos peritoneais de camundongos e (3) comportamento polissacarídico em condição fisiológica gástrica, em que serão avaliadas as alterações químicas e respostas biológicas de polissacarídeos frente à digestão estomacal *in vitro*.

5.1 ANÁLISES QUÍMICAS DE POLISSACARÍDEOS

Neste item serão abordadas as análises químicas de carboidratos, especialmente polissacarídeos, obtidos a partir de extrações aquosas e alcalinas de *P. niruri*, conforme o fluxograma abaixo (Figura 13).

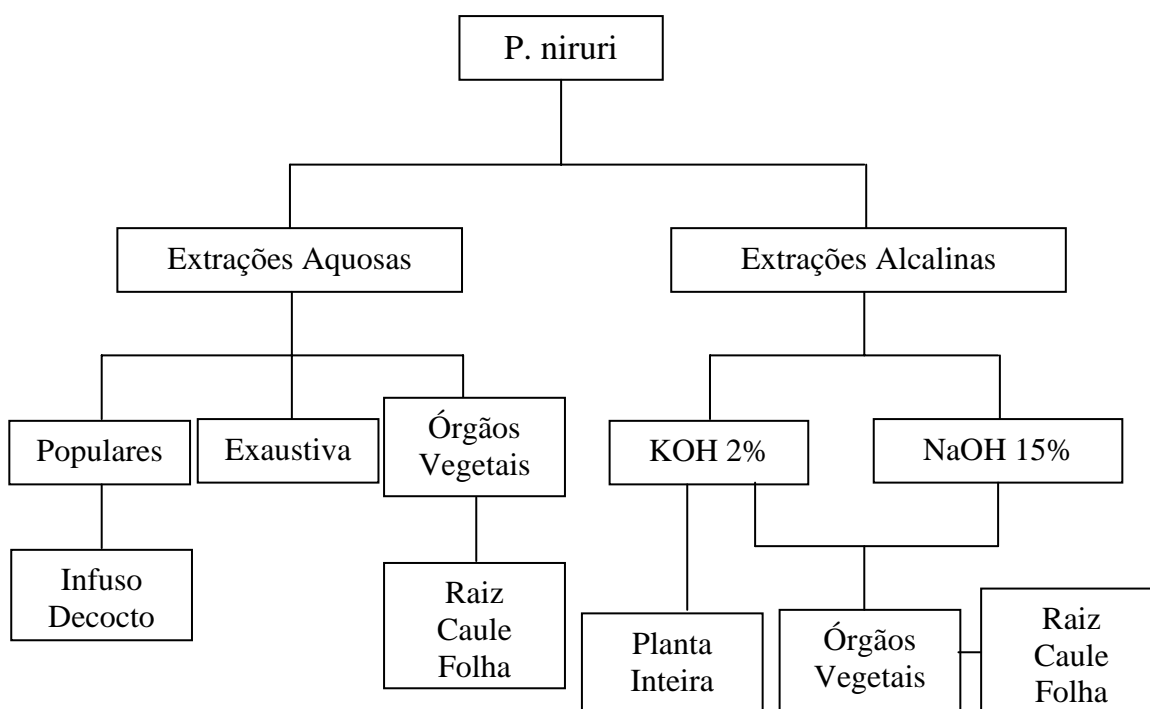


Figura 13 – Fluxograma das extrações aquosas e alcalinas realizadas com *P. niruri*.

Os resultados obtidos a partir dos órgãos vegetais separados serão abordados em item único, após as extrações realizadas com a planta inteira.

5.1.1 Extrações Aquosas

5.1.1.1 Extrações aquosas populares

As extrações aquosas realizadas pela população que faz uso do chá de quebra-pedra podem ser obtidas por meio de infusão ou decocção. Com o intuito de comparar o conteúdo polissacarídico obtido por ambas formas de extração, amostras de 200 g de *P. niruri*, seca e moída, foram submetidas, separadamente, a estes processos, como mostra a Figura 14 (A) e (B).

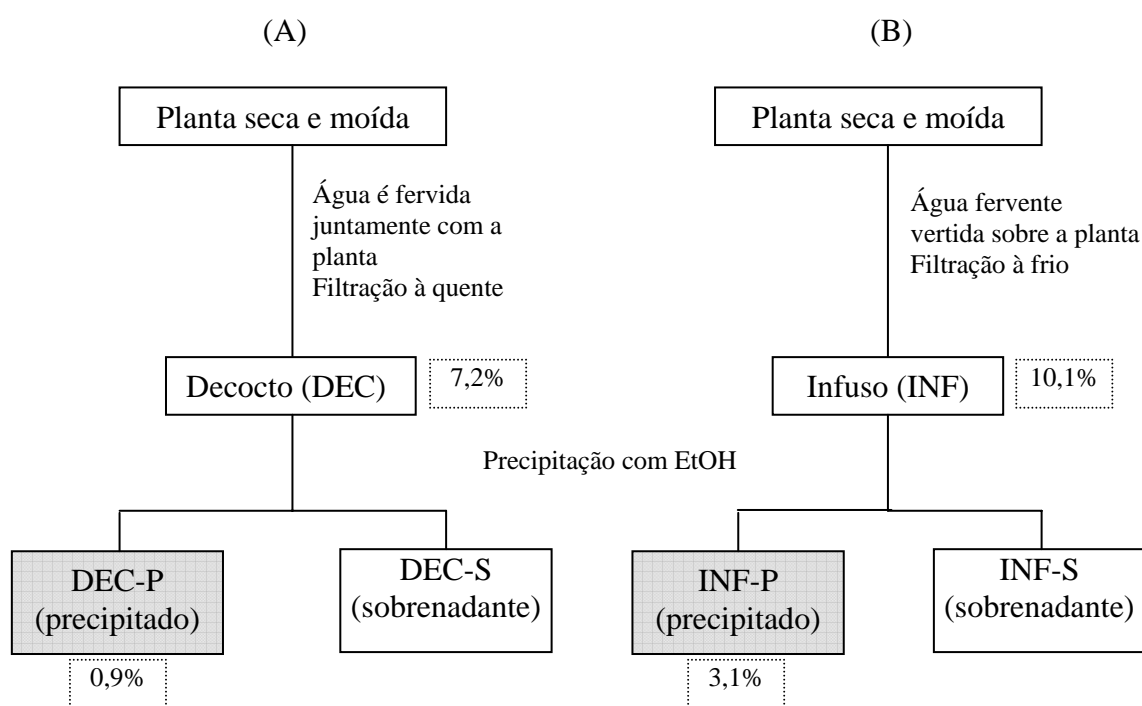


Figura 14 - Fluxograma dos processos de obtenção dos extratos por (A) decocção e (B) infusão.

Os rendimentos observados nos extratos brutos foram de 7,2% para o decocto (DEC) e 10,1 % para o infuso (INF). Após o tratamento com etanol, as frações DEC e INF foram separadas em seus sobrenadantes e precipitados etanólicos, sendo que o decocto deu origem a fração DEC-P (precipitado etanólico), com rendimento de 0,9%, e o infuso originou a fração INF-P (precipitado etanólico) a qual rendeu 3,1%. A formação de precipitados etanólicos em ambos decocto e infuso demonstram que, mesmo sendo estas formas brandas de extração, estes extratos apresentam polímeros de alta massa molar, não sendo constituído somente de metabólitos secundários (Figura 15). Analisando estes componentes de alta massa molar que compõem os chás de quebra-pedra, pôde-se observar a presença de polissacarídeos e proteínas. Ao realizar uma dosagem de açúcar total, foi possível observar que as frações DEC-P e INF-P apresentam 19% de polissacarídeos na sua composição. Já a dosagem de proteínas demonstrou a presença de 10% e 30% de proteínas para o decocto e infuso, respectivamente.

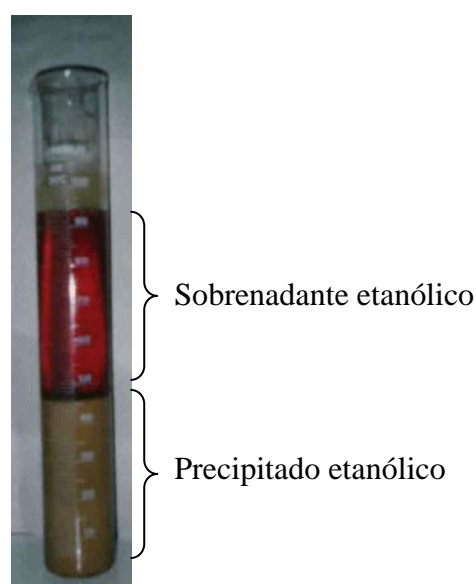


Figura 15 – Precipitação etanólica do infuso de *P. niruri*.

Analisando a composição monossacarídica destas frações (Tabela 01), pode-se observar uma grande similaridade entre elas, sendo glucose, galactose, xilose e arabinose os principais monossacarídeos encontrados. Parte da grande quantidade de

glucose deve-se a presença de amido, confirmada pelo resultado positivo no teste do lugol, uma vez que o amido é mais facilmente extraído, pois não faz parte da parede celular vegetal, sendo encontrado em grânulos, como forma de reserva energética para o vegetal (MILLS et al., 2005). Já a presença de galactose e arabinose pode ser oriunda de uma arabinogalactana de parede celular.

Tabela 01 - Composição monossacarídica das frações DEC-P e INF-P.^a

Amostra	Composição Monossacarídica (mol%) ^b							
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	AU ^c
DEC-P	5	-	10	12	7	18	39	9
INF-P	1	3	11	11	4	27	26	17

^a obtidas no precipitado etanólico do decocto e infuso, respectivamente.

^b analisados em GC-MS, na forma de alditóis acetato, coluna OV-225, temperatura 40-220°C.

^c ácidos urônicos.

Com o intuito de purificar este(s) polissacarídeo(s), as frações DEC-P e INF-P foram submetidas, sequencialmente, aos processos de congelamento e descongelamento, diálise em membrana e ultrafiltrações, como demonstrados na Figura 16.

As frações DEC-E10 e INF-E10, originadas a partir do decocto e infuso, respectivamente, foram quimicamente analisadas. Primeiramente, foi realizada a análise da composição monossacarídica (Tabela 02), na qual foi observada uma grande similaridade entre as frações, chamando a atenção para os percentuais de arabinose e galactose em ambas as frações. Foi também observada a presença de ácidos urônicos em ambas as amostras. Os percentuais de glucose diminuíram consideravelmente após os procedimentos de purificação adotados. Esta glucose não é referente ao amido, pois o teste do lugol é negativo.

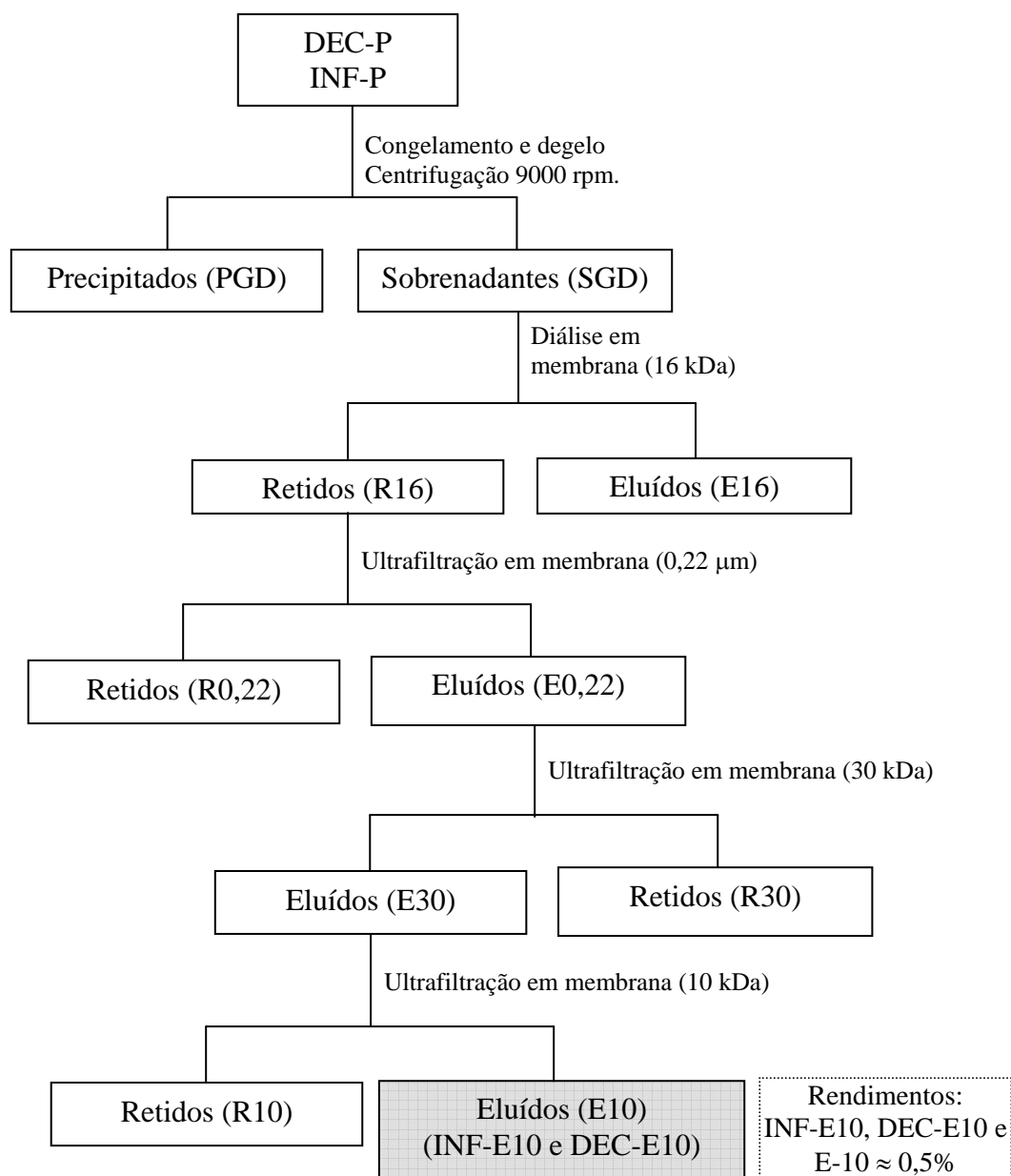


Figura 16 - Fluxograma de purificação de polissacarídeos do infuso (INF-E10) e decocto (DEC-E10) de *P. niruri*.

Tabela 02 - Composição monossacarídica das frações DEC-E10 e INF-E10.

Amostra	Composição Monossacarídica (mol%) ^a						
	Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	AU ^b
DEC-E10	5	25	5	6	32	16	11
INF-E10	7	24	4	9	27	20	9

^a analisados em GC-MS, na forma de alditóis acetato, coluna OV-225, temperatura 40-220°C.

^b ácidos urônicos.

Partindo da grande similaridade entre as amostras, estas foram analisadas em relação ao grau de homogeneidade em HPSEC (Figura 17 A e B). As amostras analisadas apresentaram um perfil de eluição muito semelhantes, quando detectadas pelo índice de refração; no entanto, a fração proveniente do infuso (INF-E10) apresentou-se homogênea, enquanto àquela proveniente do decocto (DEC-E10), heterogênea. O fato de INF-E10 apresentar perfil homogêneo possibilitou o cálculo da massa molar média da molécula, que foi equivalente a $3,5 \times 10^4$ g/mol, com $dn/dc=0,305$. A análise de massa cumulativa (Figura 17 C) demonstrou que 95% das moléculas encontram-se próximo à massa calculada, concluindo que a polidispersividade deste polissacarídeo é pequena.

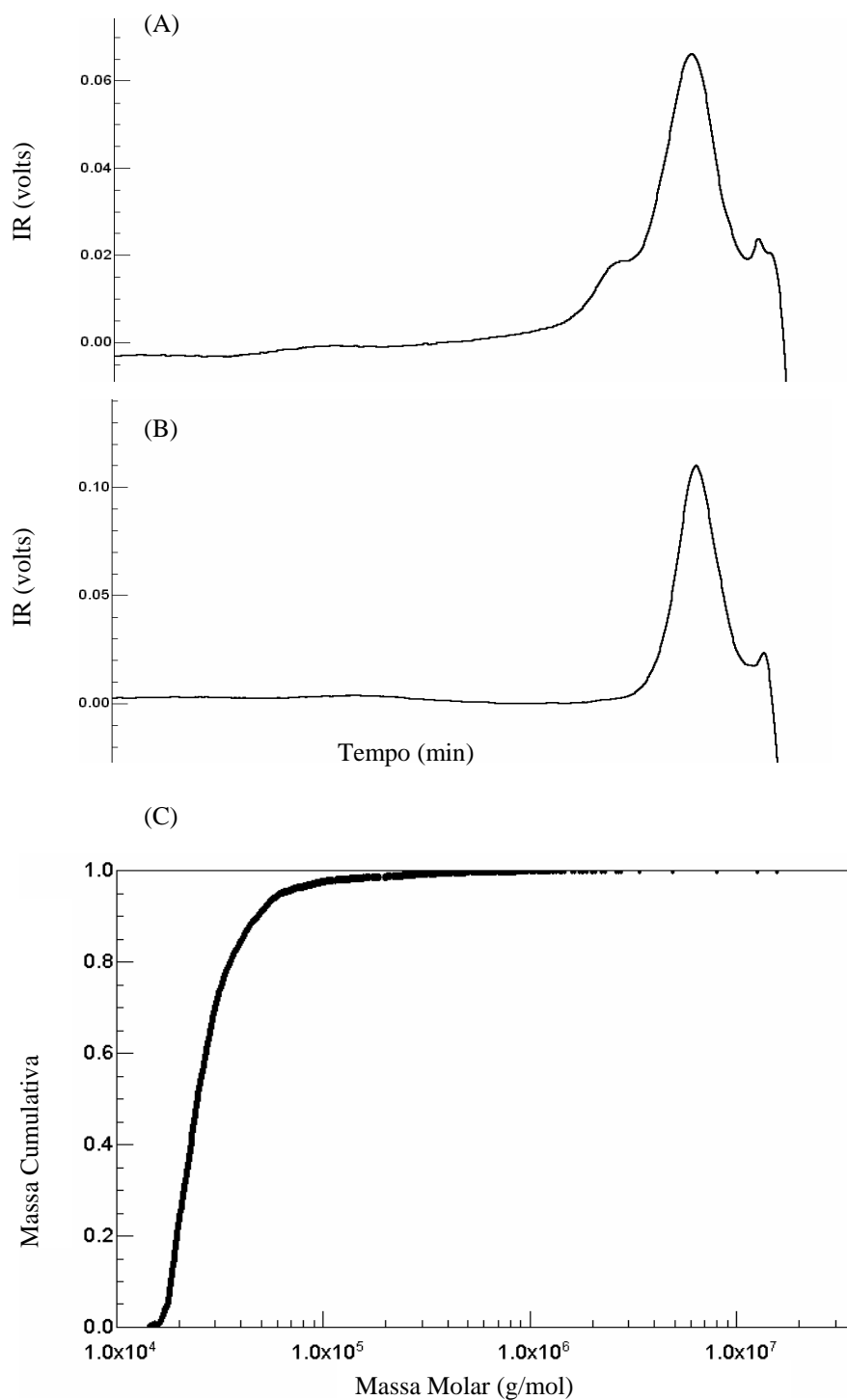


Figura 17 – Perfil de eluição de (A) DEC-E10 e (B) INF-E10 em HPSEC, detectado pelo índice de refração. (C) Determinação da massa cumulativa em relação à massa molar de INF-E10. Solvente: água Milli Q, 1,0 mg.mL⁻¹.

É intrigante o fato de, apesar de adotados os mesmos passos de purificação, DEC-E10 não ter apresentado um perfil homogêneo, como o observado para o infuso, especialmente ao se comparar a grande similaridade entre as composições monossacarídicas. Uma explicação razoável para este fato pode considerar que DEC-E10 seja constituída pelo mesmo polissacarídeo encontrado em INF-E10, contendo diferentes massas molares. Partindo desta suposição, as amostras foram submetidas à análise de RMN- ^{13}C , como mostra a Figura 18.

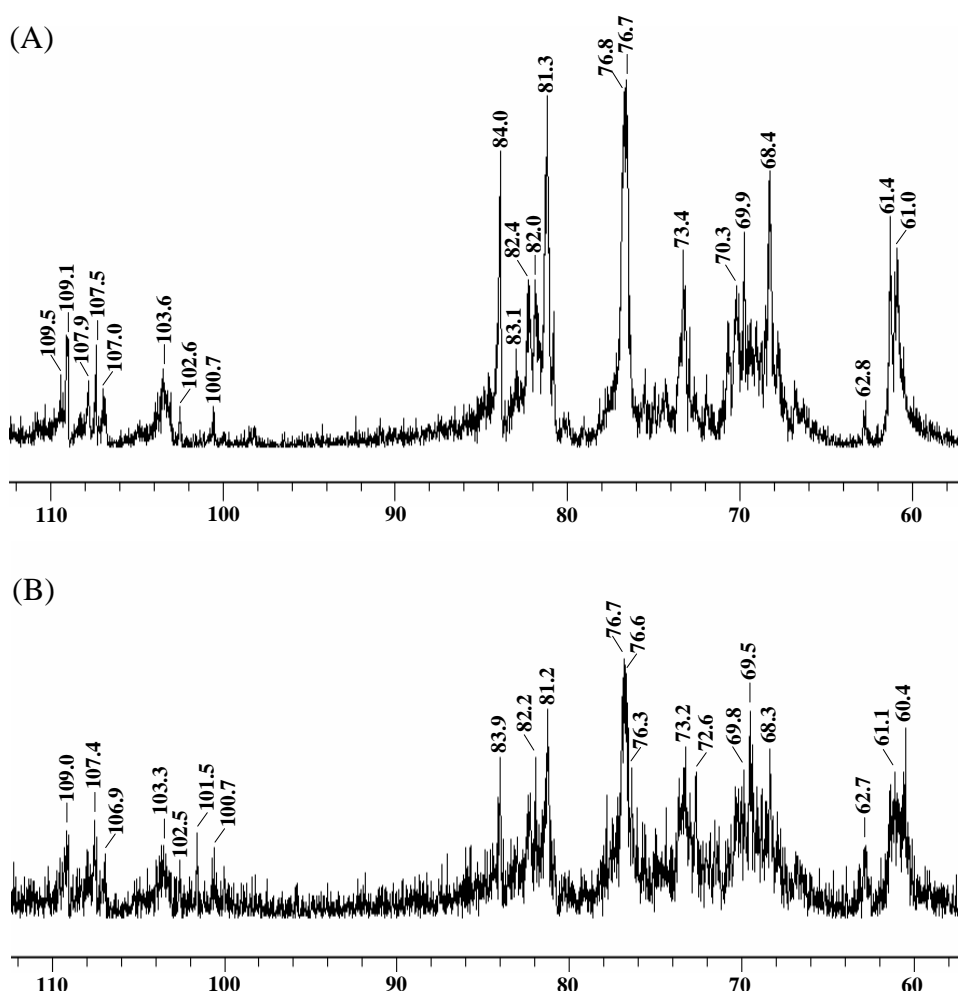


Figura 18 – Espectros de ^{13}C -RMN de (A) INF-E10 e (B) DEC-E10. Experimento realizado em D_2O , 50°C . Valores expressos em δ (ppm).

Os espectros ilustrados são similares e demonstram o alto grau de complexidade destes polissacarídeos. As regiões anoméricas apresentam assinalamentos entre δ 106,9 e 109,5 que compreendem unidades de α -Araf (DELGOBO et al., 1998; TISCHER, GORIN, IACOMINI, 2002; CIPRIANI et al., 2004) e em torno de δ 103,5, referentes às unidades de β -Galp (EDASHIGE e ISHII, 1997; DELGOBO et al., 1998; TISCHER, GORIN, IACOMINI, 2002; CIPRIANI et al., 2004).

Os dados obtidos a partir das composições monossacarídicas e RMN- ^{13}C sugerem a presença de arabinogalactanas como o polissacarídeo constituinte de ambos decocto e infuso. Esta sugestão pode ser fortalecida pelos dados de metilação, que apesar de não terem sido conclusivos devido à escassez de material, apresentaram majoritariamente os derivados 2,3,5-Me₃-Ara, referentes aos terminais não-redutores de arabinose e 2,3,6-Me₃-Gal, referentes às unidades de galactose ligadas em O-4, sugerindo a presença de arabinogalactanas do tipo I.

Todos os dados apontam conjuntamente para o fato de que as arabinogalactanas contidas no infuso e no decocto são o mesmo tipo de molécula e que, muito provavelmente, o decocto encontra-se composto por uma única classe de molécula, com diferentes massas molares.

Sabendo-se que as arabinogalactanas de diversas fontes naturais já foram caracterizadas como polissacarídeos imunomoduladores (WAGNER e JORDAN, 1998; SAMUELSEN et al., 1998; INNGJERDINGEN et al., 2005) e antitumorais (MORETÃO et al., 2004; IM et al., 2005) e que estes polissacarídeos estão presentes em ambos o infuso e o decocto, foi de grande interesse dar continuidade a outros estudos envolvendo estas moléculas. Assim, extrações aquosas mais drásticas (item 4.1.1.2) foram realizadas para comparação do conteúdo polissacarídico encontrado, além de obtenção de maior quantidade da arabinogalactana obtida por decocção e infusão.

5.1.1.2 Extração aquosa exaustiva

Esta etapa do trabalho foi realizada submetendo a planta seca e moída (1 kg) a extrações sequenciais com água a 100°C até exaustão do processo. O objetivo desta etapa foi a obtenção de polissacarídeos de *P. niruri* até que não houvessem mais carboidratos para serem extraídos em água. Esta exaustão do processo foi monitorada pela reação de fenol em ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). As extrações foram sequenciais (6 h cada), totalizando 60 h de extração (Figura 19). O rendimento do extrato bruto total foi de 11,0% e, após precipitação em etanol, o sobrenadante etanólico (EAS) apresentou um rendimento total de 6,7%, enquanto o precipitado etanólico (EAP), de 4,2%.

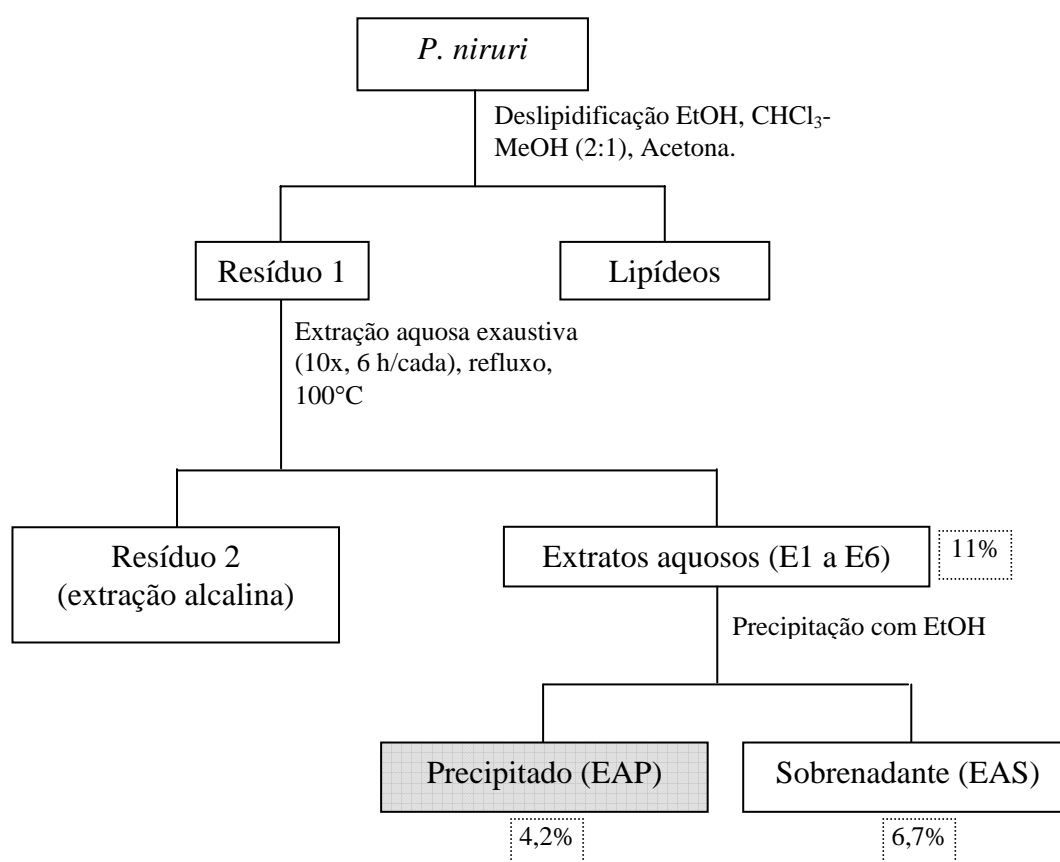


Figura 19 - Fluxograma do processo de extração aquosa exaustiva de *P. niruri*.

A fim de monitorar esta extração seqüencial quanto ao conteúdo de carboidratos que se extraía ao longo das 60 h, o material oriundo do precipitado etanólico de cada extração em separado foi submetido a uma cromatografia em papel (Figura 20). Desta forma, pôde-se avaliar, por exemplo, se a extração de amido ocorreria logo no início do processo, ou se a extração amido-polissacarídeos de parede celular estariam ocorrendo concomitantemente.

Como observado na Figura 20, os extratos E1 a E6, previamente hidrolisados, foram cromatografados e, com o uso de diversos padrões de monossacarídeos neutros e ácidos, pôde-se observar que os extratos apresentaram, exatamente, o mesmo perfil cromatográfico, indicando que este processo extrativo não é seletivo para a obtenção de amido e/ou outro polissacarídeo de parede celular. Foi também demonstrada a presença de ácidos urônicos em todos os extratos. Os extratos E1 a E6 foram reunidos, constituindo a fração denominada de EAP.

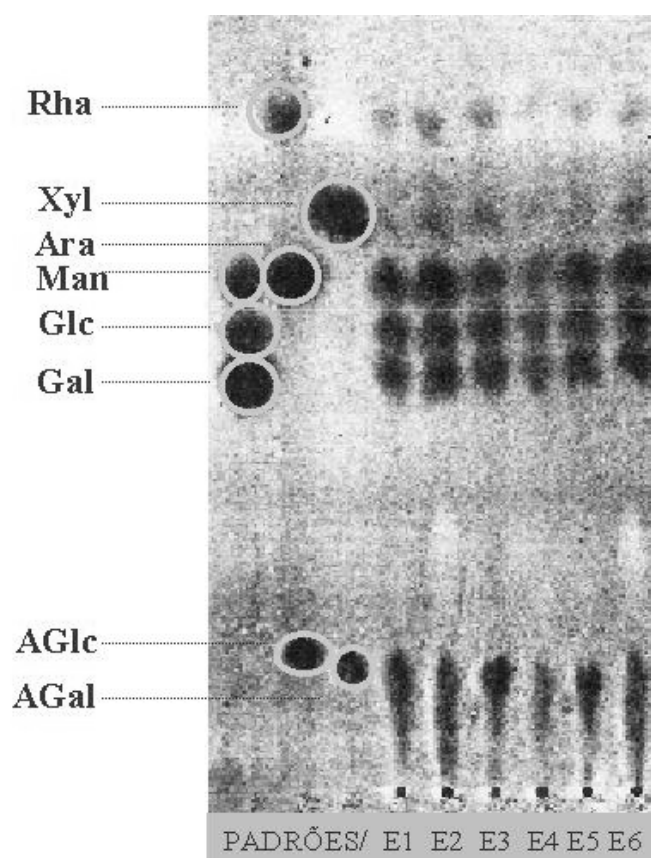


Figura 20 – Análise do perfil cromatográfico em cromatografia em papel dos extratos aquosos hidrolisados obtidos, seqüencialmente, a 100°C.

A composição monossacarídica (análise por GC-MS) de EAP apresentou 6:17:7:6:27:37 de Rha:Ara:Xyl:Man:Gal:Glc. Assim como o observado para o infuso e decocto, a quantidade de glucose é elevada, podendo ser proveniente do amido. A semelhança entre os três extratos: o infuso, o decocto e a extração exaustiva é também válida para os outros monossacarídeos, com destaque para os maiores percentuais de galactose e arabinose.

O precipitado etanólico (EAP) foi então submetido às mesmas etapas de purificação realizadas para o infuso e decocto (ver Figura 16), as quais compreenderam congelamento e descongelamento, diálise em membrana e ultrafiltrações. A amostra sobrenadante do congelamento e descongelamento, que ficou retida na membrana de diálise com limite de exclusão de 16 kDa e foi ultrafiltrada, seqüencialmente, nas membranas com limites de exclusão de 0,22 µm, 30 kDa e 10 kDa (AG-E10), foi quimicamente analisada, visando comparar os resultados desta amostra com àqueles observados para o decocto (DEC-E10) e infuso (INF-E10).

Inicialmente, analisando a composição monossacarídica de AG-E10 (Tabela 03), pode-se observar uma similaridade entre os dados, uma vez que, as três amostras apresentam, majoritariamente, arabinose e galactose.

Tabela 03 - Composição monossacarídica das frações DEC-E10, INF-E10 e AG-E10 e AG-E10 carboxi-reduzida (CRAG-E10).

<u>Amostra</u>	<u>Composição Monossacarídica (mol%)^a</u>						
	Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	AU ^b
DEC-E10 ^c	5	25	5	6	32	16	11
INF-E10 ^c	7	24	4	9	27	20	9
AG-E10	8	35	9	4	21	8	15
CRAG-E10	14	18	7	5	48	8	tr^d

^a analisados em GC-MS, na forma de alditóis acetato, coluna OV-225, temperatura 40-220°C.

^b ácidos urônicos.

^c dados repetidos da Tabela 02, a título ilustrativo.

^d traços.

O próximo passo foi analisar o perfil de eluição de AG-E10 em HPSEC para comparar o grau de homogeneidade (Figura 21). O perfil de eluição foi sobreposto àquele encontrado para o infuso (INF-E10-Figura 17). Uma vez que a amostra apresentou perfil homogêneo, foi submetida ao cálculo da massa molar média, sendo encontrado o valor de $3,4 \times 10^4$ g/mol, igual ao observado para o infuso. Estes dados sugerem que as três amostras em questão (infuso, decocto e extração aquosa exautiva) são constituídas pelo mesmo tipo de molécula, ou seja, uma arabinogalactana.

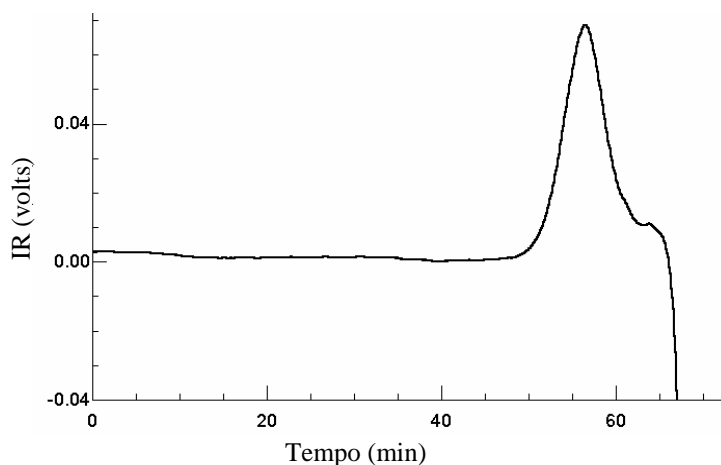


Figura 21 – Perfil de eluição de AG-E10 em HPSEC, detectado pelo índice de refração. Solvente: água Milli Q, $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Partindo deste pressuposto, análises de ^{13}C -RMN e metilação foram realizadas visando averiguar a veracidade desta hipótese. Os espectros de ^{13}C -RMN estão mostrados na Figura 22. Assim como o obtido para a composição monossacarídica, perfil cromatográfico em HPSEC e massa molar, os espectros também apontam similaridades. De maneira geral, pode-se observar que estas moléculas apresentam grande complexidade. Só a região anomérica de AG-E10 apresenta 11 assinalamentos. Dentre estes, os sinais entre δ 109,5 e 107,3 (BELESKI-CARNEIRO, GANTER e REICHER, 2000; DONG e FANG, 2000; FRANSEN et al., 2000; MENESTRINA et al., 1998; TISCHER, GORIN e IACOMINI, 2002) são referentes às unidades de α -Araf, enquanto os sinais em δ 103,7 e 102,8 foram atribuídas às de unidades de β -Galp (BELESKI-CARNEIRO, GANTER e REICHER, 2000; DONG e FANG, 2000; FRANSEN et al.,

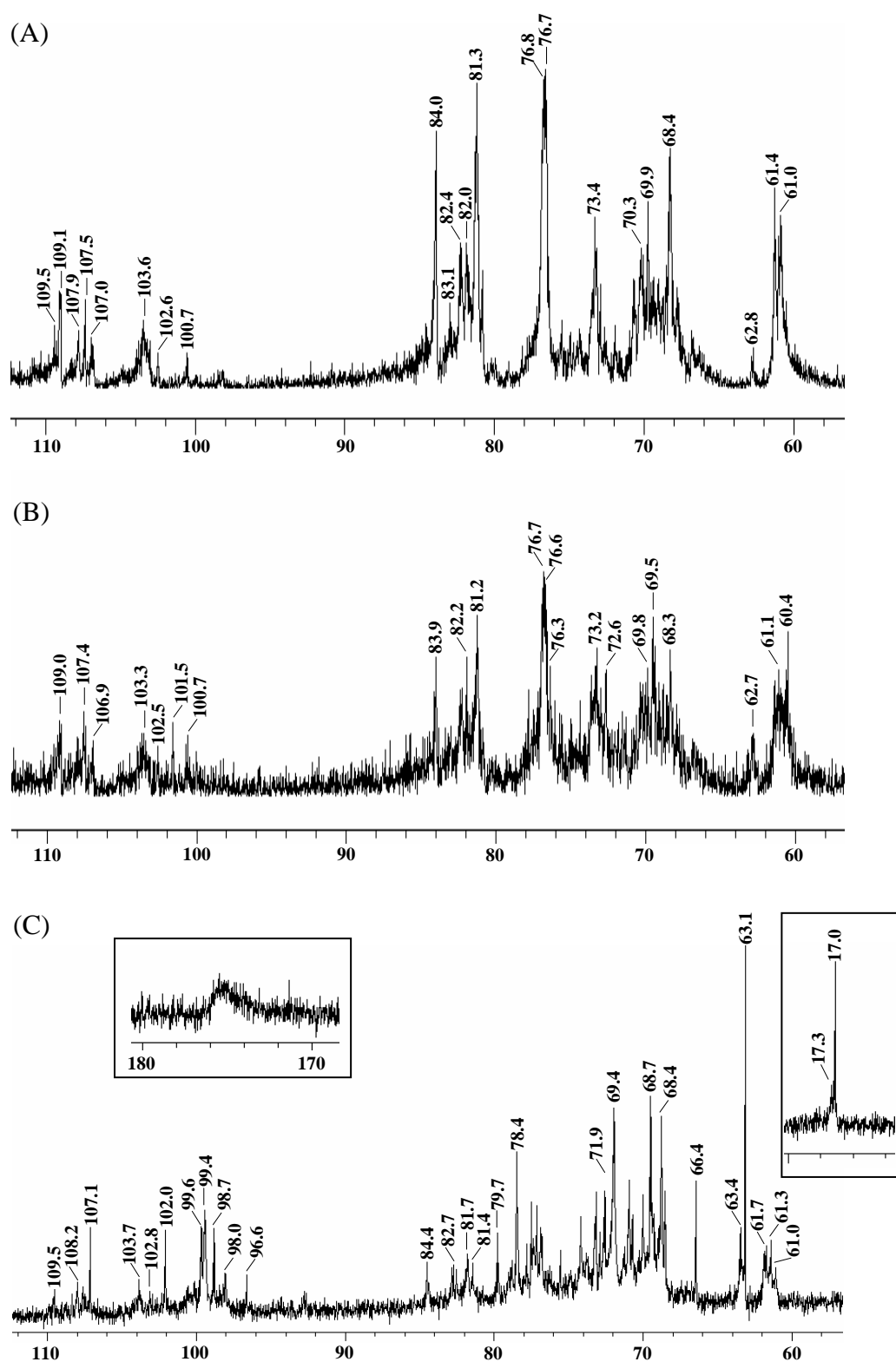


Figura 22 – Espectros de ^{13}C -RMN de (A) INF-E10, (B) DEC-E10 e (C) AG-E10. Experimento realizado em D_2O , 50°C . Valores expressos em δ (ppm).

2000; MENESTRINA et al., 1998; NAVARINI et al., 1999). O sinal em δ 102,0 é proveniente das unidades de β -GalpA (TISCHER, GORIN e IACOMINI, 2002), enquanto o sinal em δ 98,7 refere-se às unidades de α -GalpA (CIPRIANI et al., 2004). Os sinais em torno de δ 99,5 podem ser oriundos das unidades de α -Rhap (DELGOBO et al., 1998).

Outra região do espectro que pode ser analisada considerando-se a complexidade da amostra envolve os valores de C-5 e C-6 de pentoses e hexoses, respectivamente. AG-E10 apresentou inversão dos sinais correspondentes aos grupamentos $-\text{CH}_2$ destes carbonos entre δ 61,0 e 63,4 ao serem analisados pelo experimento de DEPT (Figura 23). Os assinalamentos em δ 61,0, 61,3 e 61,7 correspondem ao C-6 de unidades de hexose não-substituídas neste carbono (BELESKI-CARNEIRO, GANTER e REICHER, 2000; DONG e FANG, 2000), enquanto os sinais em δ 63,1 e 63,4 são característicos de unidades de pentoses não-substituídas em C-5 (NAVARINI et al., 1999; DONG e FANG, 2000).

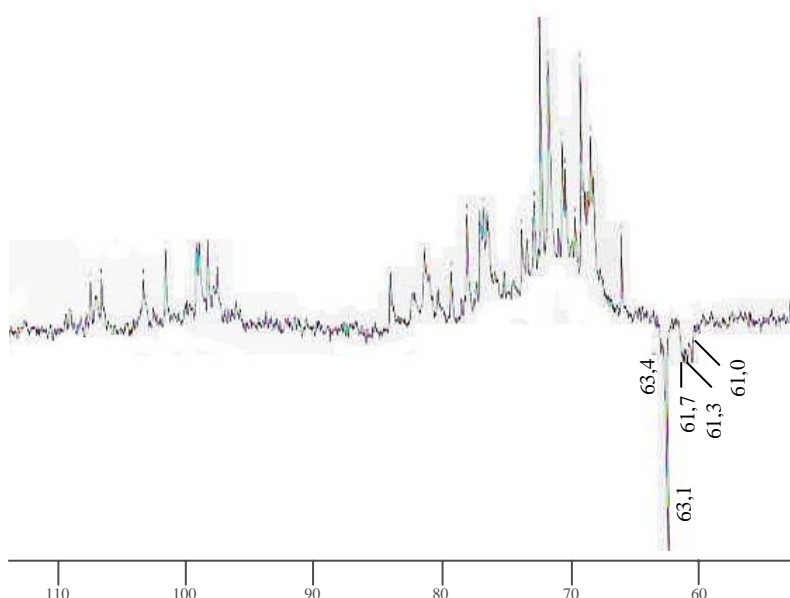


Figura 23 - Espectros de DEPT de AG-E10.
Experimento realizado em D_2O , 50°C. Valores expressos em δ (ppm).

O espectro de ^{13}C -RMN ainda apresentou assinalamentos característicos em δ 17,0 e 17,1, correspondentes aos grupamentos $-\text{CH}_3$ não substituídos e substituídos de Rhap, respectivamente (DELGOBO et al., 1998; TISCHER, GORIN e IACOMINI, 2002), além de um sinal mal definido em torno de δ 175,6, referentes aos grupamentos $-\text{COOH}$ do ácido galacturônico (DELGOBO et al., 1998; CIPRIANI et al., 2004).

O próximo passo para obter a caracterização química de AG-E10 foi realizar uma carboxi-redução com o intuito de confirmar o tipo de ácido urônico (15%) e a forma de ligação deste na estrutura da arabinogalactana. A composição monossacarídica da amostra carboxi-reduzida (CRAG-E10) apresentou um aumento de 27% no percentual de galactose, indicando que o polímero apresenta o ácido galacturônico em sua estrutura. Os percentuais de Rha:Ara:Xyl:Man:Gal:Glc na amostra carboxi-reduzida (Tabela 03) foram de 14:18:7:5:48:8, respectivamente. Ao serem comparados os valores de ramnose, pode-se observar um aumento de 6% deste monossacarídeo, levando a crer que o ácido urônico em questão estava ligado nas unidades de Rha, tornando-as menos suscetíveis à hidrólise ácida.

A metilação foi realizada para ambas as amostras nativa e carboxi-reduzida. Os dados da fração CRAG-E10 (Tabela 04) confirmaram a presença de uma molécula complexa, visto o número de derivados metilados obtidos. Em especial, foi observado um elevado percentual do derivado 2,3,5-Me₃-Ara (16%) referente aos terminais não-redutores da molécula. Terminais não-redutores foram também observados para unidades de xilose (3%), glucose (3%) e galactose (6%). As cadeias laterais compreendem unidades de Rhap substituídas em O-2 (8%), O-3 (1%) e disubstituídas em O-2,4 (3%); unidades de unidades de Araf substituídas em O-5 (3%) e O-2 (1%) e unidades de Xylp substituídas em O-4 (4%). Foram ainda observadas unidades 3-O (2%) e 4-O (3%) -substituídas de Glcp e 6-O- substituídas de Galp que estão parcialmente substituídas em O-3 (3%).

A cadeia principal desta arabinogalactana é constituída por unidades de β -Galp ligadas (1 \rightarrow 4) que encontram-se parcialmente substituída em O-3 (2%), O-2 (2%) e O-6 (2%) e disubstituída em O-3,6 (1%). O fato das unidades de Rhap e GalpA não serem observadas como terminais não redutores aliado ao aumento do derivado 2,3,6-

Me₃-Gal após carboxi-redução pode ser justificado pela presença de uma cadeia péctica, formada por unidades de GalpA (1→4) ligadas    unidades de Rha_p em O-2, como descrito na literatura clássica para as arabinogalactanas do tipo I (RIDLEY, O'NEILL e MOHNEN, 2001).

Tabela 04 - Análise de metila  o da fra  o CRAG-E10 (arabinogalactana).

Acetato de alditol <i>O</i> -metilado ^a	R _t ^b	Mol%
2,3,5-Me ₃ -Ara	0,84	16
2,3,4- Me ₃ -Xyl	0,89	3
3,5-Me ₂ -Ara	0,95	1
3,4-Me ₂ -Rha	0,96	8
2,4-Me ₂ -Rha	0,98	1
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	1,00	3
2,3-Me ₂ -Ara	1,02	3
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	1,04	6
2,3-Me ₂ -Xyl	1,05	4
3-Me-Rha	1,16	3
2,4,6-Me ₃ -Glc	1,23	2
2,3,6-Me ₃ -Gal	1,25	36
2,3,6-Me ₃ -Glc	1,27	3
2,3,4-Me ₃ -Gal	1,38	1
2,6-Me ₂ -Gal	1,44	2
3,6-Me ₂ -Gal	1,53	2
2,3-Me ₂ -Gal	1,70	2
2,4-Me ₂ -Gal	1,76	3
2-Me-Gal	1,97	1

^a analisados em GC-MS, na forma de alditóis acetato, coluna DB-225, 215   C.

^b R_t = tempo de reten  o relativo ao acetato de 2,3,4,6-Me₄-glucitol.

Os dados obtidos das extrações aquosas populares (decocto e infuso) associados aos obtidos da extração aquosa exaustiva sugerem que os extratos populares, bem como o extrato exaustivo apresentam uma arabinogalactana do tipo I como polissacarídeo constituinte. Além disso, apesar da extração exaustiva ser muito mais drástica que a decocção e infusão, o conteúdo de carboidratos extraídos se mostra muito similar, sugerindo que, independente do tempo de extração, a água quente por si só é capaz de extrair moléculas de alta massa molar, as quais podem estar contribuindo de alguma forma para os efeitos biológicos gerais observados pelo uso de infusos e decoctos de quebra-pedra.

5.1.2 Extrações Alcalinas

Após extração exaustiva em água, o material residual das extrações aquosas (Resíduo 2- Figura 19) foi submetido à extrações alcalinas, fazendo-se uso de KOH 2%. Os processos de extração e purificação estão ilustrados na Figura 24.

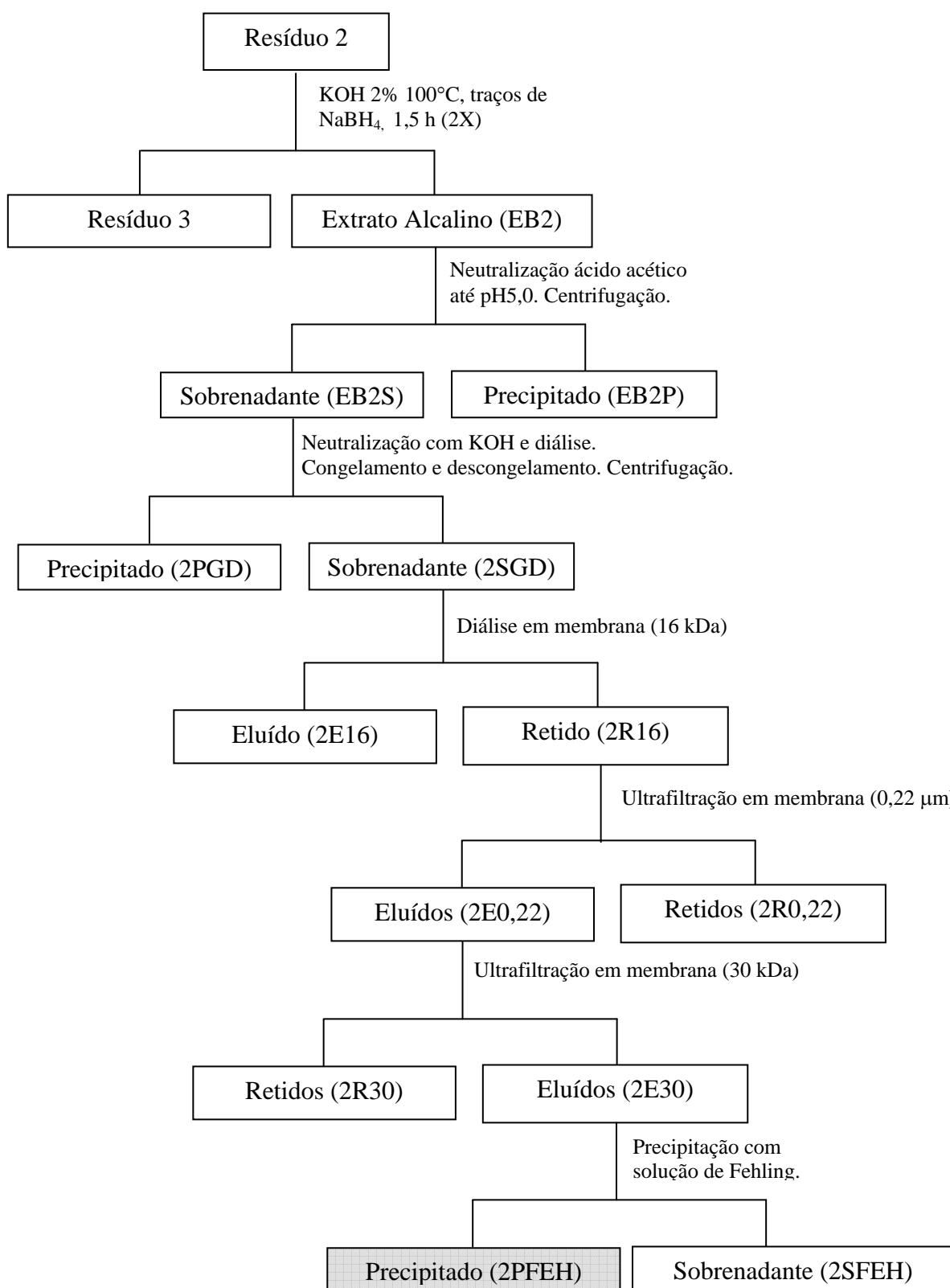


Figura 24 - Fluxograma de extração e purificação dos polissacarídeos de *P.niruri*, obtidos após tratamento alcalino (KOH 2%).

De forma geral, o protocolo de purificação adotado nas extrações alcalinas foi muito semelhante ao das extrações aquosas, exceto pela substituição da precipitação etanólica pela precipitação em ácido acético. Em extrações alcalinas, opta-se pela utilização da precipitação em ácido acético para que se favoreça a separação das hemiceluloses A e B, a primeira contendo polímeros ácidos (precipitam) e a segunda, neutros (não precipitam) (SJÖSTROM, 1993). Após as etapas de diálise em membranas de 16 kDa e ultrafiltração em membranas, foi observada a heterogeneidade das amostras ao serem analisadas por HPSEC (Figura 25). Assim, a amostra 2E30 foi submetida a uma etapa adicional de purificação: precipitação com solução de Fehling, gerando um precipitado (2PFEH) e um sobrenadante (2SFEH). As composições monossacarídicas durante o processo de purificação estão demonstradas na Tabela 05.

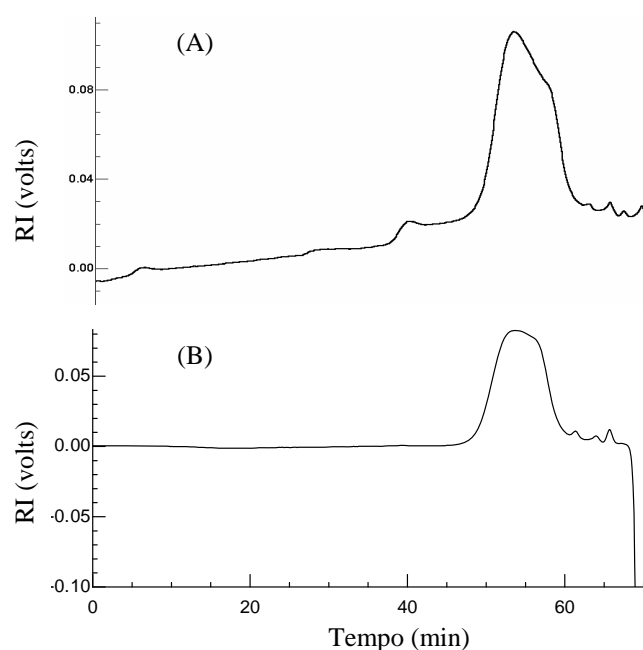


Figura 25 – Perfis de eluição de (A) 2R16 e (B) 2E30 analisadas em HPSEC. Solvente: água Milli Q, 1,0 mg.mL⁻¹.

Tabela 05 - Composições monossacarídicas ao longo do processo de purificação do extrato alcalino (EB2).

Amostra	Composição Monossacarídica (mol%) ^a						
	Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	AU ^b
EB2	-	43	33	-	15	9	nd ^c
2SGD	9	16	34	2	25	15	nd ^c
2E30	7	21	53	-	19	-	nd ^c
2SFEH	7	38	5	2	29	1	18
2PFEH	8	9	58	-	7	1	17

^a analisados em GC-MS, na forma de alditóis acetato, coluna OV-225, temperatura 40-220°C.

^b ácidos urônicos.

^c não determinado.

É interessante observar que os percentuais de xilose das amostras analisadas são, em geral, muito mais elevados em relação às frações dos extratos aquosos (~ 5-10%). Este fato deve-se à maior extração de hemiceluloses ao usar um álcali como agente extrator, pois este é capaz de romper as ligações entre polímeros, elevando os percentuais de xilose, provenientes de xilanas da parede celular (SUN et al., 2001). Após a precipitação com solução de Fehling, pôde-se observar uma grande diferenciação entre os monossacarídeos que compõem estas amostras. A fração 2SFEH contém altos percentuais de arabinose e galactose, enquanto a fração 2PFEH apresentou majoritariamente xilose. A princípio, pode-se supor que 2SFEH trata-se de uma arabinogalactana ácida, enquanto 2PFEH trata-se de uma heteroxilana ácida.

Ambas 2SFEH e 2PFEH foram analisadas quanto à homogeneidade (Figura 26) e o sobrenadante de Fehling ainda apresentou um perfil heterogêneo, enquanto o precipitado de Fehling apresentou um perfil homogêneo.

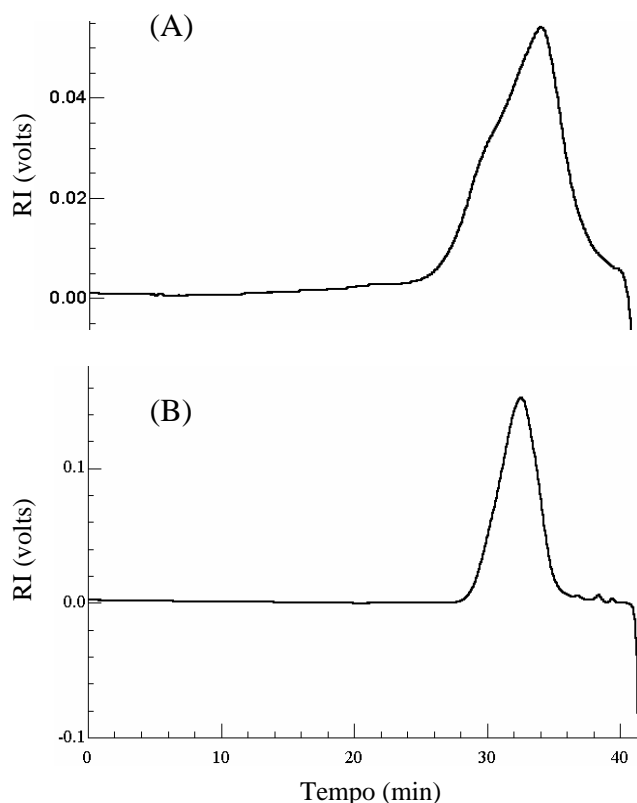


Figura 26 – Perfis de eluição de (A) 2SFEH e (B) 2PFEH analisadas em HPSEC. Solvente: água Milli Q, 1,0 mg.mL⁻¹.

Uma vez que 2PFEH apresentou um perfil homogêneo, foi dado continuidade às análises químicas desta molécula. Inicialmente, foi calculada massa molar do polissacarídeo, que apresentou $1,6 \times 10^5$ g/mol, com dn/dc de 0,142. Em seguida, a amostra foi analisada por ^{13}C -RMN (Figura 27), confirmando a presença de uma heteroxilana de estrutura complexa nesta fração, em que foram observados cinco sinais intensos em δ 101,5; 76,2; 73,6; 72,6 e 63,0 referentes aos C1, C-4, C-2, C-3 e C-5 das unidades de β -Xylp (SIMAS et al., 2004). A região anomérica do espectro apresentou, ainda, sinais em δ 107,3; 106,9 e 106,2 referentes às unidades de α -Araf *O*-substituídas e terminais não-redutores, respectivamente (CIPRIANI et al., 2004). Sinais referentes às β -Galp em δ 104,2 e 103,3 também foram observados (CIPRIANI et al., 2004). Os sinais em δ 98,3 e 97,4 correspondem às

unidades de α -Rhap e α -GlcA, respectivamente (BOCHICCHIO e REICHER, 2003). Outras regiões do espectro foram possíveis de serem assinaladas de acordo com a literatura: em δ 82,3 e 59,7 referentes aos C-4 e CH₃ das unidades de ácido *O*-metilurônico (REICHER et al., 1994) e em δ 61,0 ao C-6 livre das unidades de β -Galp.

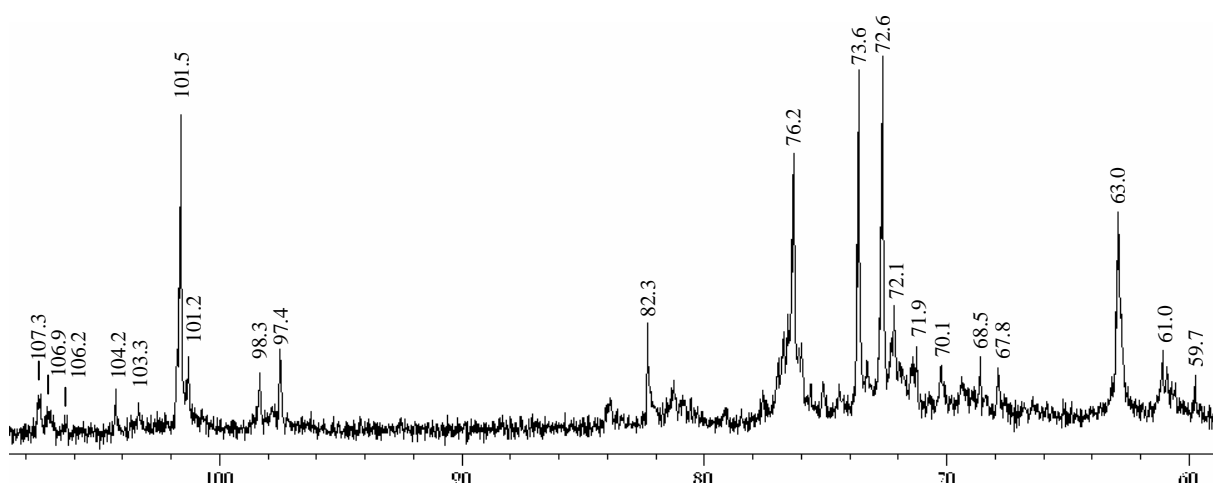


Figura 27 - Espectro de ^{13}C -RMN de 2PFEH, obtido com extração alcalina a 2%. Experimento realizado em D₂O, 50°C. Valores expressos em δ (ppm).

A dosagem de ácidos urônicos (Tabela 05) revelou a presença de 17% destes na fração 2PFEH e o espectro de ^{13}C -RMN apresentou sinais característicos de unidades de ácido metilurônico. A análise confirmatória destes dados deu-se por meio da carboxi-redução da molécula, seguida de análise em GC-MS. A Figura 28 apresenta em (A) o cromatograma do polissacarídeo nativo, enquanto em (B), do polissacarídeo carboxi-reduzido. Este último apresentou um aumento significativo no percentual de glucose, que passou de 1 para 7%, mostrando que a molécula apresenta o ácido glucurônico como constituinte. Também foi observado o surgimento de um pico com fragmentação característica de metilglucose (16%). A redução com NaBD₄ foi utilizada para determinar que o ácido urônico naturalmente metilado trata-se do ácido 4-*O*-metilglucurônico, uma vez que foram observados os fragmentos de massa/carga (m/z) em 87, 99, 129, 159 e 189. Após carboxi-redução,

a composição monossacarídica da heteroxilana ácida passou a ser de Rha:Ara:Xyl:4-*O*-metilglucose:Gal:Glc em uma razão molar de 5:5:59:17:7:7.

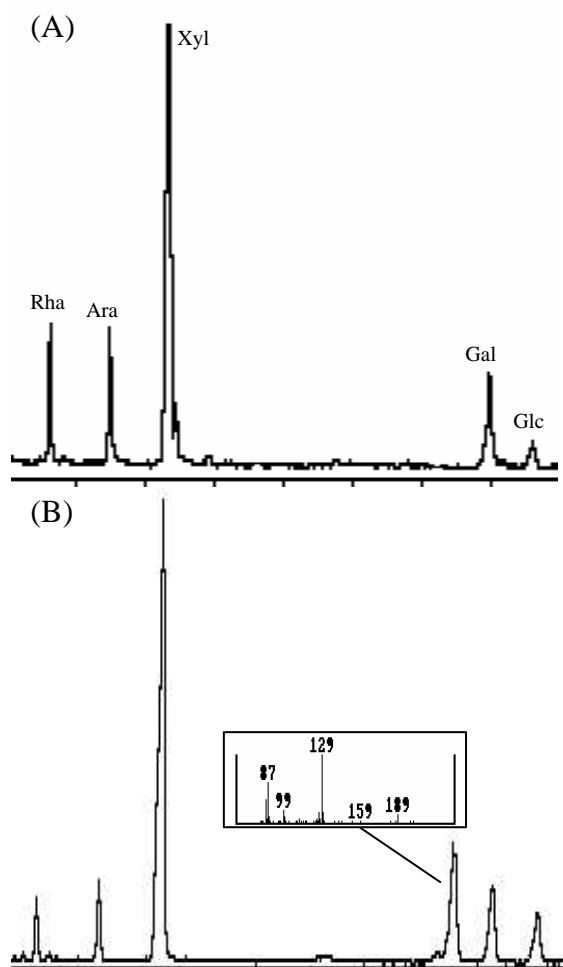


Figura 28 – Perfis de eluição das amostras (A) 2PFEH nativa e (B) carboxi-reduzida em GC-MS. Análise na forma de acetatos de alditóis, coluna OV-225, temperatura de 40-220 °C. Inseto: fragmentação do ácido 4-*O*-metilglucurônico, usando NABD₄ como agente redutor.

Os dados analisados demonstram a alta complexidade da heteroxilana ácida, que foi confirmada pelos dados de metilação da amostra carboxi-reduzida (CR2PFEH), conforme demonstrado na Tabela 06.

Tabela 06 - Análise de metilação da fração CR2PFEH (heteroxilana- carboxi-reduzida).

Acetato de alditol <i>O</i> -metilado ^a	Fragmentos (<i>m/z</i>) ^b	Mol%
2,3,5-Me ₃ -Ara	87,101,102,118,129,161	2
2,3,4- Me ₃ -Xyl	88,101,102,117,118,161,162	2
3,4-Me ₂ -Rha	88,89,115,130,131,190	3
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	87,102,118,129,145,161,162,205	7
2,3-Me ₂ -Ara	87,102,118,129,189	2
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	87,102,118,129,145,161,162,205	6
2,3-Me ₂ -Xyl	87,102,118,129,189	46
3-Me-Rha	88,101,117,130,143,160,190,203	3
2-Me-Ara	85,99,118,127,159,201	1
2- Me-Xyl ^c	85,99,118,127,159,201	7
3-Me-Xyl ^c	87,88,129,130,189,190	
3,4,6- Me ₃ -Glc	87,88,101,129,130,145,161,190	17
Xyl	86,103,115,128,145,188	4

^a analisados em GC-MS, na forma de acetatos de alditóis, coluna DB-225, 215 °C.

^b fragmentos obtidos usando NaBD₄ como agente redutor.

^c ambos derivados foram quantificados em conjunto devido a co-eluição na coluna utilizada.

O polissacarídeo apresentou diversos derivados metilados, dentre eles terminais não-redutores de Araf (2%), Xylp (2%), Galp (6%), Glcp (1%) e Glcp (6%). As cadeias laterais são compostas por unidades de Rhap substituídas em O-2 (3%) e disubstituídas em O-2,4 (3%), unidades de Araf substituídas em O-5 (2%) e disubstituídas em O-3,5 (1%). O derivado 2,3-Me₂-Xyl (46%) corresponde às unidades de β-Xylp ligadas em O-4, constituindo a cadeia principal do polímero. Estas unidades de xilose da cadeia principal encontram-se parcialmente substituídas em O-2 ou O-3 (7%) e totalmente substituídas em O-2 e O-3 (4%).

A amostra carboxi-reduzida (CR2PFEH), diferente da amostra nativa, apresentou um aumento de 6% do derivado 2,3,4,6-Me₄-Glc, correspondente às unidades terminais não-redutoras de ácido glucurônico (6%) e um alto percentual do derivado 3,4,6-Me₃-Glc (17%), referente às unidades de ácido 4-*O*-metilglucurônico. Embora a metilação não tenha sido realizada com iodeto de metila deuterado (CD₃I), o fato deste último derivado não estar presente como terminais não-redutores chama a atenção, uma vez que é incomum na literatura. A partir destes dados, pode-se supor que os terminais não-redutores de arabinose, xilose, galactose e até de ácido glucurônico podem estar substituindo o O-2 do ácido 4-*O*-metilglucurônico.

As xilanas constituem a classe de hemiceluloses mais abundantes em vegetais superiores (JOSELEAU, COMTAT e RUEL, 1992) e apresentam uma grande diversidade estrutural entre gêneros e espécies, no entanto, a cadeia principal é geralmente constituída por unidades de β -Xylp (1 \rightarrow 4) ligadas, como observado para a heteroxilana ácida, extraída com KOH 2% da planta toda de *P. niruri*.

É interessante observar que, apesar das xilanas ácidas estarem comumente distribuídas na parede celular secundária de vegetais, uma atenção especial têm sido dada a esta classe de biomoléculas, devido às propriedades que a literatura vêm demonstrando. Podem ser citados como exemplos as propriedades industriais e biológicas, como no estudo desenvolvido por NANDINI e SALIMATH (2001), no qual os autores demonstram o uso de heteroxilanas no processo de panificação; ou ainda, no estudo desenvolvido por NOSAL`OVA e colaboradores (2001), em que os autores traçam a relação entre conteúdo de ácidos urônicos e atividade antitussígena.

Uma vez que este trabalho trata de uma planta medicinal, amplamente utilizadas nas regiões tropicais e subtropicais do globo, é interessante observar que estas moléculas podem, por meio de mecanismos ainda não esclarecidos, participar do efeito geral da planta quando utilizada para fins medicamentosos. Apesar desta heteroxilana não ser extraída em grandes quantidades nos chás popularmente utilizados, vale lembrar que, além do uso de plantas medicinais na forma de chá, uma parcela da população faz uso de plantas medicinais por meio de cápsulas

preenchidas com a planta rasurada, ou seja, contendo toda a ampla diversidade de polissacarídeos que compõem a parede celular do vegetal em questão.

5.1.3 Extrações dos Órgãos Vegetais

Este item do trabalho propõe o estudo comparativo entre os polissacarídeos de diferentes órgãos vegetais, ao serem submetidos a diferentes extrações. Este estudo é justificado pelo uso popular de alguns órgãos vegetais em separado. No Brasil, muitos ainda fazem uso só das folhas na forma de infusão, já em regiões orientais, é indicado o uso de raízes de quebra-pedra em aplicações tópicas.

Devido a maior facilidade de separação manual dos órgãos, optou-se por realizar este estudo com raízes, caules e folhas. Os frutos e sementes necessitariam de um maior preparo para separação, uma vez que são muito pequenos, então foi optado por apenas retirá-los.

As plantas foram coletadas *in natura* e a partir da planta toda foram obtidos 13,4 g de raízes, 41,4 g de caules e 19,9 g de folhas, totalizando 74,7 g de material seco. Considerando os percentuais dos órgãos obtidos, pode-se concluir que, a planta inteira sem frutos e inflorescências é constituída por 18% de raízes, 55% de caules e 27% de folhas.

Optou-se ainda por realizar extrações aquosas e alcalinas, usando como agentes alcalinos o KOH 2% e NaOH 15% (Figura 13, pág.55).

5.1.3.1 Extrações aquosas dos órgãos vegetais

As extrações aquosas e o processo de semi-purificação dos polissacarídeos foram realizadas como ilustrado na Figura 29.

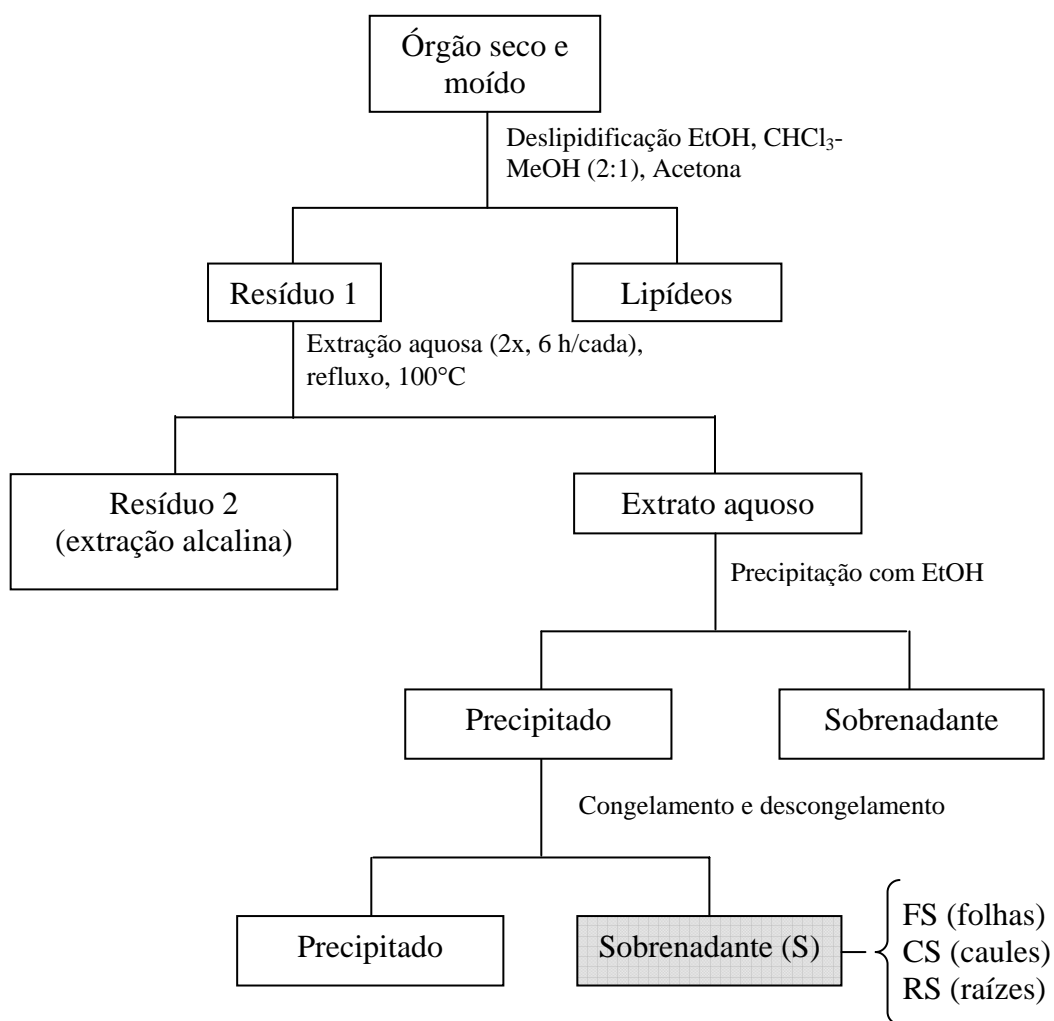


Figura 29 - Fluxograma do processo de extração aquosa e fracionamento de polissacarídeos dos órgãos vegetais de *P. niruri*.

Comparando as composições monossacarídicas dos três órgãos em estudo (Tabela 07), pôde-se observar uma grande similaridade entre eles, com maiores percentuais de arabinose, galactose, glucose e ácido urônico. Não surpreendentemente, estes monossacarídeos podem estar relacionados com a presença de arabinogalactanas, presentes nas paredes celulares dos órgãos.

Tabela 07 – Composição monossacarídica dos diferentes órgãos vegetais, extraídos em água.

Amostra	Composição Monossacarídica (mol%) ^a							
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	AU ^b
FS ^c	9	2	16	4	9	26	19	15
RS ^c	10	6	15	5	3	18	18	25
CS ^c	9	1	15	2	7	27	25	14

^a analisados em GC-MS, na forma de alditóis acetato, coluna OV-225, temperatura 40-220°C.

^b ácidos urônicos.

^c FS= folhas, RS= raízes, CS- caules.

Analizando os perfis cromatográficos das amostras em HPSEC (Figura 30), pode-se observar um perfil muito heterogêneo, podendo indicar a presença de diferentes polissacarídeos compondo estas amostras, ou ainda, polissacarídeos iguais com massas molares diferentes. Os “ombros” apresentados nos cromatogramas podem indicar a presença de agregados moleculares, comumente observados em polissacarídeos (WANG et al., 2001). Os perfis de eluição das folhas (A) e caules (B) apresentaram maior similaridade e complexidade, enquanto o das raízes (C) se mostrou menos complexo.

Os espectros de ¹³C-RMN (Figura 31), apresentam-se muito similares entre os diferentes órgãos, sendo possível observar a presença de três sinais na região anomérica de FS (A), em δ 103,3, 102,1 e 99,9, característicos de unidades de β -Galp (BELESKI-CARNEIRO, GANTER e REICHER, 2000; DONG e FANG, 2000; FRANSEN et al., 2000; MENESTRINA et al., 1998; NAVARINI et al., 1999), β -GalpA ou β -Glc pA (TISCHER, GORIN e IACOMINI, 2002) e α -Glc p, respectivamente. Este dado é justificável, uma vez que estes são os componentes monossacarídicos majoritários na amostra. Os espectros correspondentes ao caule (B) e raiz (C) apresentaram a região referente a ácidos urônicos (δ ~99) mais intensa

quando comparado com o espectro da folha. Os altos percentuais de glucose podem estar relacionados com a presença de amido nas amostras.

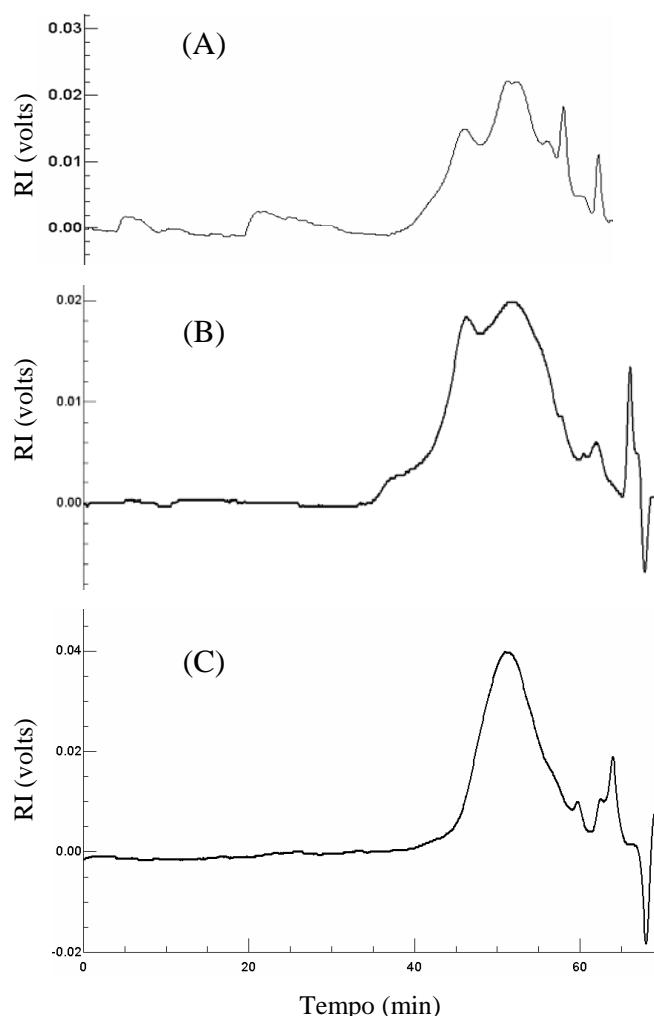


Figura 30 – Perfis de eluição de (A) FS, (B) CS e (C) RS analisadas em HPSEC. Solvente: NaNO_2 , $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Os espectros ainda fornecem sinais intensos na região entre C-2 e C-6, com um alto grau de complexidade. Os sinais em δ 78,2, 73,0, 72,8, 70,2, 60,6 podem estar relacionados com C-4, C-5, C-2, C-3 e C-6 de $\alpha\text{-Glc}$ (amilose), respectivamente (MELLINGER, 2002). Já os sinais em δ 81,7, 75,4, 68,3, 67,6 e 61,1 podem indicar os carbonos C-3, C-5, C-2, C-4 e C-6 das unidades de $\beta\text{-Gal}$ (DELGOBO et al., 1998), podendo indicar a cadeia principal de uma arabinogalactana como um dos componentes da amostra. Os espectros ainda forneceram um sinal intenso entre δ 52,7 e δ 53,2 indicando uma ligação C-N, podendo eventualmente sugerir a presença de

unidades de açúcar aminado nas amostras (HUCKERBY, BROWN e NIEDUSZYNSKI, 1995; IACOMINI et al., 1999).

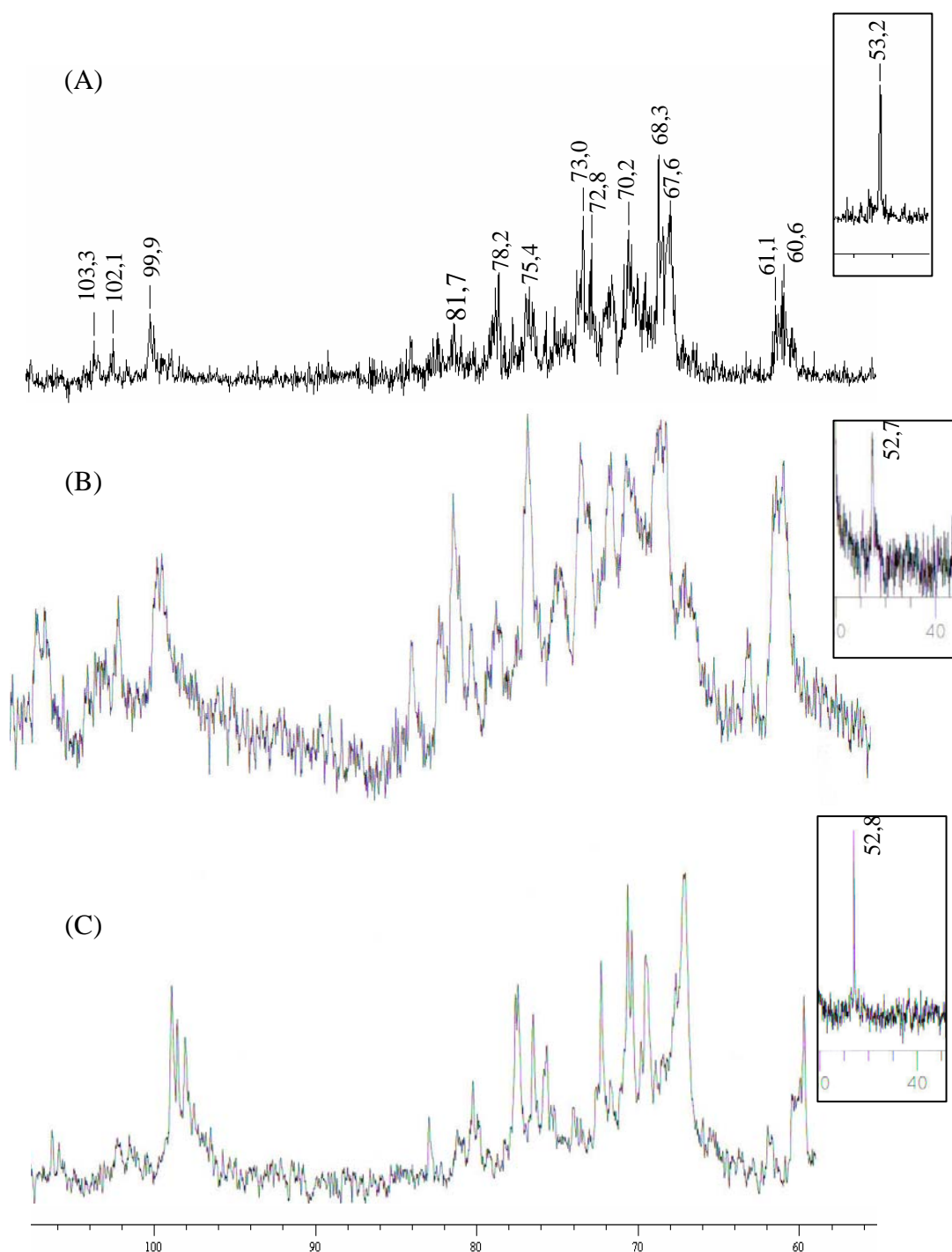


Figura 31 - Espectros de ^{13}C -RMN de (A) FS, (B) CS e (C) RS, obtidos a partir do extrato aquoso de folhas, caules e raízes, respectivamente. Experimento realizado em D_2O , 50°C . Valores expressos em δ (ppm).

5.1.3.2 Extrações alcalinas dos órgãos vegetais

5.1.3.2.1 Extrações alcalinas com KOH 2% dos órgãos vegetais

O material residual (resíduo 2) das extrações aquosas de cada órgão vegetal (raízes, caules e folhas) foi submetido a extrações alcalinas, fazendo-se uso do KOH 2%. Os processos de extração e semi-purificação das extrações alcalinas estão ilustrados na Figura 32.

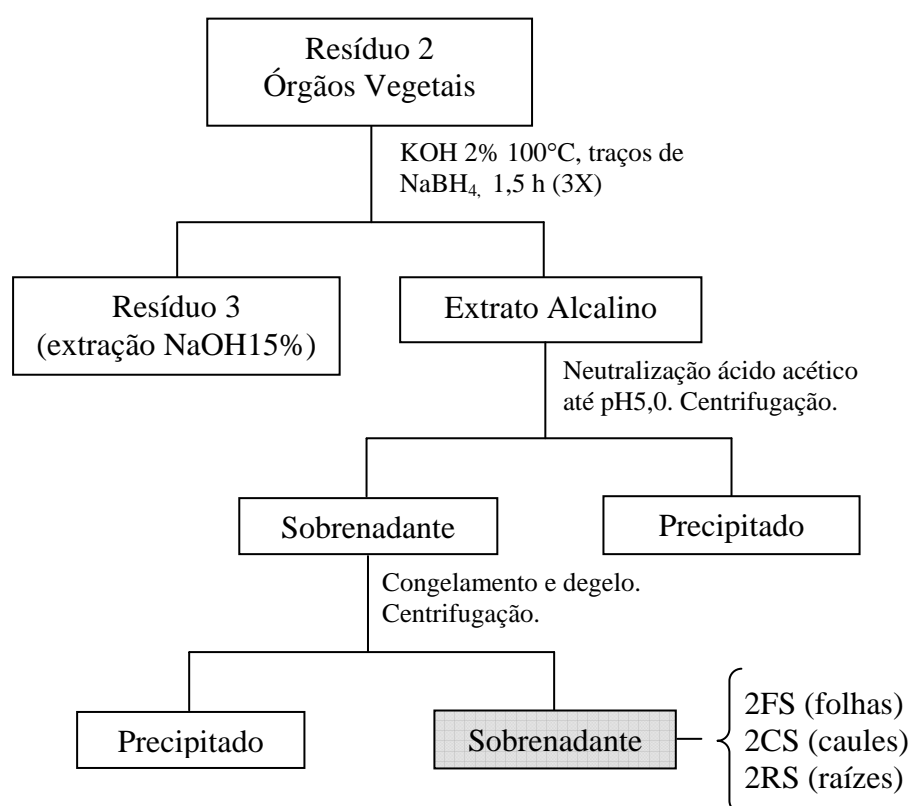


Figura 32 - Fluxograma do processo de extração alcalina com KOH 2% e semi-purificação de polissacarídeos dos órgãos vegetais de *P. niruri*.

Analisando a composição monossacarídica dos extratos alcalinos com KOH 2% das folhas, caules e raízes (Tabela 08), pode-se observar uma grande similaridade entre os percentuais encontrados para caules e raízes, nos quais o conteúdo de xilose foi de ~40%. Ao comparar estes resultados com o extrato das folhas, o percentual de

xilose foi de apenas 5%, ao passo que, os valores encontrados para ramnose e galactose foram de 32 e 25%, respectivamente. Esta diferença é interessante tanto do ponto de vista químico como biológico. Considerando as diferentes funções que os órgãos desempenham na manutenção da vida do vegetal, a parede celular de folhas pode, por exemplo, apresentar uma maior quantidade de pectinas, já que a expansão celular é essencial na realização da fotossíntese. Já as raízes e caules, órgãos de sustentação, necessitam de paredes celulares mais rígidas, com um maior grau de entrelaçamento das microfibrilas de celulose e hemiceluloses, apresentando, portanto, maior quantidade de xilose (JOSELEAU, COMTAT e RUEL, 1992)

Uma vez que a composição monossacarídica da heteroxilana ácida, obtida a partir do extrato alcalino (KOH 2%) da planta inteira, apresentou Rha:Ara:Xyl:Gal:Glc:GlcA na relação 8:9:58:7:1:17, pode-se supor que este tipo de polissacarídeo seja originado a partir dos caules e/ou raízes e, menos provavelmente, das folhas.

Tabela 08 – Composição monossacarídica dos diferentes órgãos vegetais, extraídos com KOH 2%.

Amostra	Composição Monossacarídica (mol%) ^a							
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	AU ^b
2FS	32	-	14	5	2	25	3	19
2RS	4	2	13	42	1	14	12	12
2CS	7	-	13	43	1	12	8	16

^a analisados em GC-MS, na forma de alditóis acetato, coluna OV-225, temperatura 40-220°C.

^b ácidos urônicos.

A análise de homogeneidade em HPSEC destas frações estão apresentadas na Figura 33. Como descrito para os extratos aquosos, os alcalinos também apresentaram perfil heterogêneo, podendo indicar a presença de diferentes polissacarídeos, ou de um polissacarídeo com diferentes massas molares.

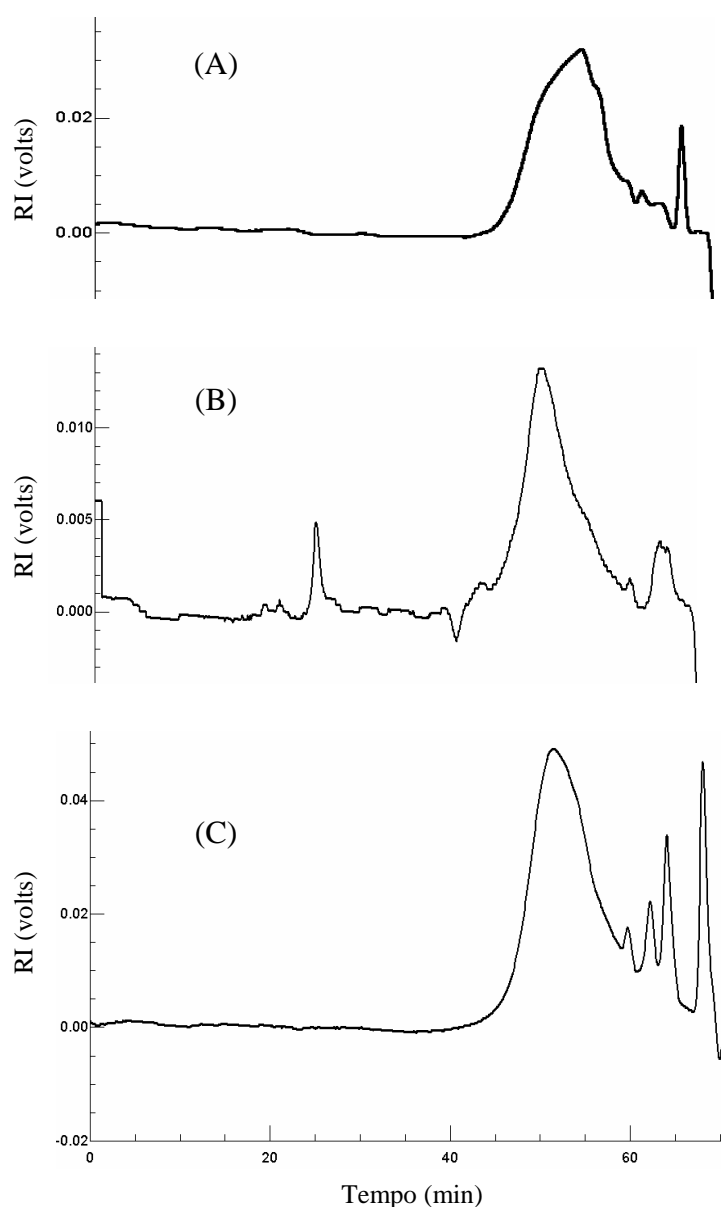


Figura 33 – Perfis de eluição de (A) 2FS, (B) 2CS e (C) 2RS analisadas em HPSEC. Solvente: NaNO_2 , $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Os espectros de ^{13}C -RMN (Figura 34) são muito elucidativos quanto aos polissacarídeos que compõem os extratos alcalinos. Na Figura 34 (A), o extrato de folhas apresentou cinco sinais na região anomérica: em δ 109,2 e 107,1 referentes às unidades de α -Araf, em δ 103,1 às unidades de β -Galp e em δ 98,0 e 97,3 às unidades de α -Rhap e α -GalA ou α -GlcA, respectivamente (CIPRIANI et al., 2004). Também foram observados assinalamentos característicos de grupamentos $-\text{CH}_3$ das unidades

de ramnose, em δ 16,6 e 16,3, indicando os grupamentos livres e substituídos, respectivamente.

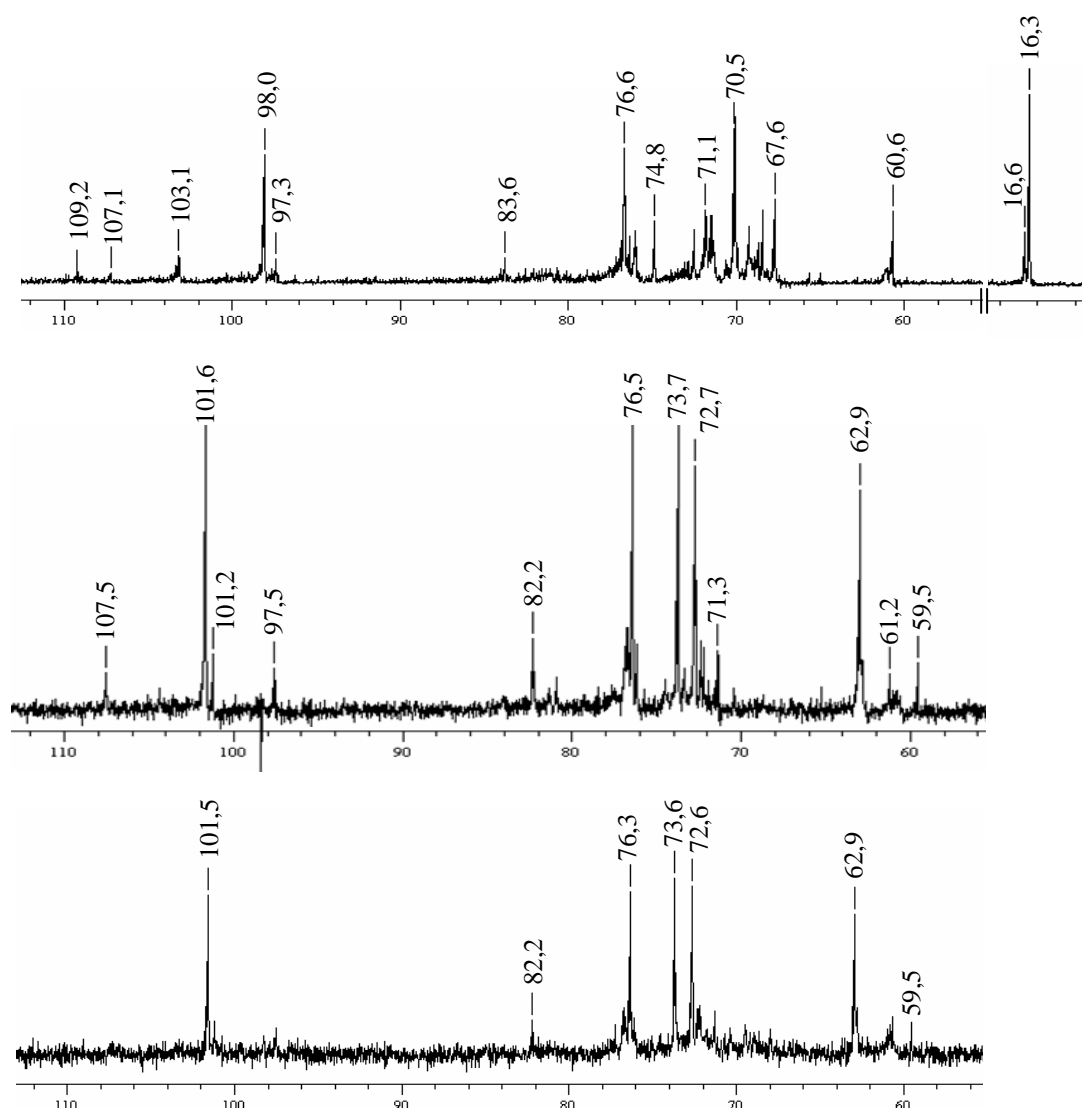


Figura 34 – Espectros de ^{13}C -RMN de (A) 2FS, (B) 2CS e (C) 2RS, obtidos a partir do extrato alcalino de folhas, caules e raízes, respectivamente. Experimento realizado em D_2O , 50°C . Valores expressos em δ (ppm).

Já os espectros de ^{13}C -RMN dos extratos obtidos a partir de caules (Figura 34 B) e raízes (Figura 34 C) apresentaram um perfil semelhante entre si e bem diferente em relação ao extrato obtido de folhas (Figura 34 A). Ambos os espectros B e C

apresentaram cinco sinais proeminentes em δ 101,6; 76,5; 73,7; 72,7 e 62,9 correspondentes aos carbonos C-1, C-4, C-2, C-3 e C-5, respectivamente, das unidades de β -Xylp. Exatamente como observado para a heteroxilana ácida, obtida a partir do extrato alcalino da planta inteira, estes extratos também apresentam assinalamentos em δ 82,2 e 59,5 correspondentes ao C-4 e $-\text{CH}_3$ do ácido 4-*O*-metilurônico, respectivamente.

Em síntese, os dados fornecidos pelos espectros de ^{13}C -RMN (Figura 34) estão de acordo com as composições monossacarídicas, sendo o extrato de folhas (A) composto por uma arabinogalactana pécica e os extratos de caules (B) e raízes (C), por uma xilana ácida substituída.

Uma vez que este estudo trata de uma planta medicinal e que propriedades biológicas com xilanas são recentemente descritas na literatura, este se torna um dado de grande interesse, pois ao se fazer uso de diferentes órgãos vegetais como forma de tratamento, não só a carga de metabólitos secundários poderá variar, mas também a de polissacarídeos biologicamente ativos.

5.1.3.2.2 Extrações alcalinas com NaOH 15% dos órgãos vegetais

Após extrações com KOH 2%, o resíduo de cada órgão do vegetal foi submetido à extrações com NaOH 15%. Este tratamento drástico, usando soluções alcalinas mais concentradas aliado à temperatura, tem por objetivo extrair os polissacarídeos mais fortemente entrelaçados da parede celular do vegetal. MELLINGER (2002) caracterizou uma xilana linear neutra obtida da planta inteira após extração nas condições usadas nesta etapa do trabalho, assim, pode ser interessante averiguar quais seriam os órgãos fornecedores desta molécula não comumente caracterizada em outras fontes vegetais (JOSELEAU, COMTAT e RUEL, 1992).

Os procedimentos de extração e fracionamento encontram-se ilustrados na Figura 35.

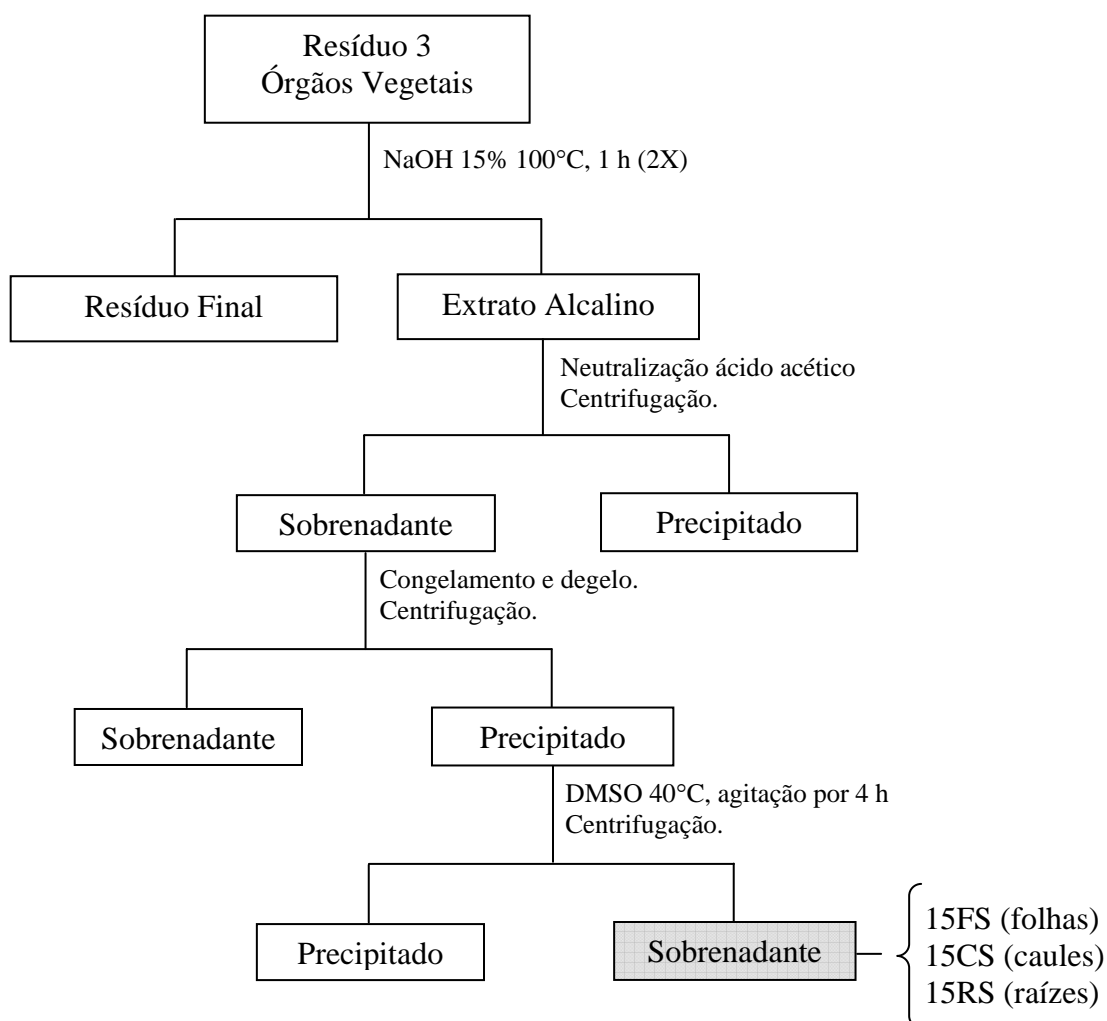


Figura 35 - Fluxograma do processo de extração alcalina com NaOH 15% e fracionamento de polissacarídeos dos órgãos vegetais de *P. niruri*.

As amostras insolúveis em água e solúveis em DMSO (15FS, 15CS, 15RS) foram investigadas quanto às suas composições monossacarídicas (Tabela 09) e, assim como o observado para as extrações alcalinas com KOH 2%, os extratos provenientes dos caules e raízes demonstraram grande similaridade entre si e diferiram consideravelmente do extrato das folhas. As amostras 15CS e 15RS apresentaram, majoritariamente, xilose na sua composição, além de altos percentuais

de glucose. Enquanto os extratos obtidos a 2% apresentaram em torno de 40% de xilose, estes extraídos com 15%, apresentam em torno de 60%. Este dado está de acordo com a literatura em que o aumento da concentração da solução alcalina favorece a liberação de hemiceluloses (SUN et al., 2001).

Tabela 09 – Composição monossacarídica dos diferentes órgãos vegetais, extraídos com NaOH 15%.

Amostra	Composição Monossacarídica (mol%) ^a						AU ^b
	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	
15FS	4	2	30	2	10	48	4
15RS	-	7	68	1	2	18	4
15CS	-	2	64	-	4	24	6

^a analisados em GC-MS, na forma de alditóis acetato, coluna OV-225, temperatura 40-220°C.

^b ácidos urônicos.

Os espectros de ¹³C-RMN das três amostras estão apresentados na Figura 36. O espectro do extrato 15FS, obtido a partir das folhas, apresentou-se mais complexo quando comparado com os outros dois extratos, obtidos a partir dos caules (15CS) e raízes (15RS). A região anomérica de 15FS apresentou seis sinais que, de acordo com a composição monossacarídica desta fração, podem indicar a presença de β-Galp (δ 105,3), β-Glcp (δ 102,5), β-Xylp (δ 101,7) e α-Glcp (δ 100,3 a 99,1) (CIPRIANI et al., 2004; SIMAS et al., 2004; CARBONERO et al., 2002). Foram ainda observados sinais em δ 63,2 e 62,0, podendo indicar a presença de C-5 das unidades de β-Xylp (SIMAS et al., 2004).

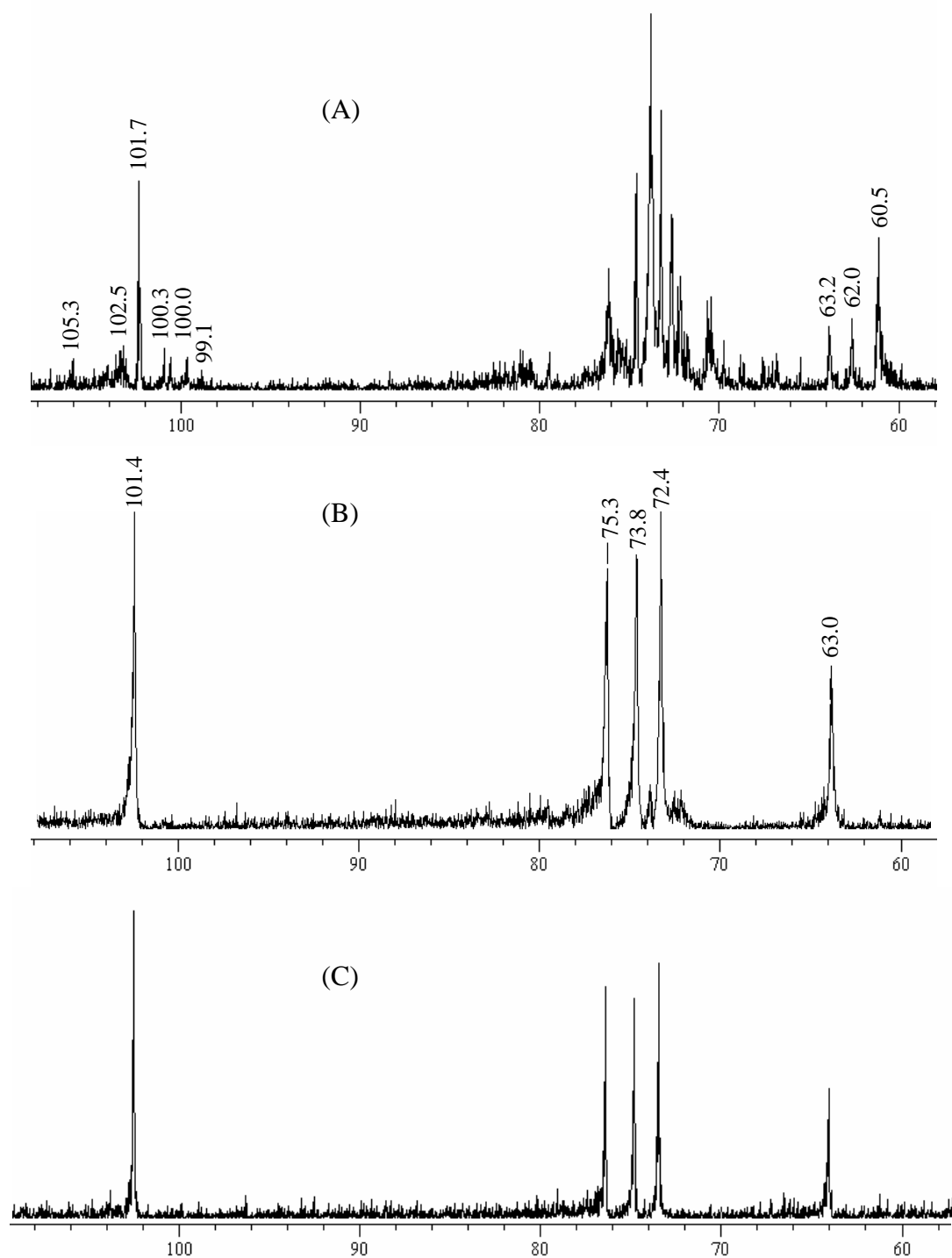


Figura 36 – Espectros de ^{13}C -RMN de (A) 15FS, (B) 15CS e (C) 15RS, obtidos a partir do extrato alcalino de folhas, caules e raízes, respectivamente. Experimento realizado em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$, 50°C . Valores expressos em δ (ppm).

Os espectros (B) e (C), referentes aos extratos obtidos dos caules e raízes, apresentaram espectros muito semelhantes, com a presença de cinco sinais proeminentes, característicos de unidades de β -Xylp ligadas (1 \rightarrow 4). Os sinais observados encontram-se em δ 101,4; 76,3; 73,8; 72,4 e 63,0 e referem-se aos carbonos C-1, C-4, C-2, C-3 e C-5 (SIMAS et al., 2004), respectivamente. O espectro do extrato alcalino, obtido a partir do caule, apresentou assinalamentos aparentemente sobrepostos e com bases mais alargadas, podendo indicar uma maior complexidade molecular se comparado com o espectro do extrato alcalino, obtido a partir da raiz.

Comparando os dados aqui analisados com àqueles obtidos por MELLINGER (2002), pode-se sugerir que a xilana linear neutra, obtida a partir da planta inteira, seja proveniente dos caules e/ou raízes de *P. niruri*. Um dado inesperado e interessante foi obtido ao analisar o conteúdo polisacarídico extraído das folhas da planta, pois este pode ser constituído por xilanas com maior grau de substituição ou ainda, por xiloglucanas da parede celular (BUSATO et al, 2001; 2005).

5.2 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE POLISSACARÍDEO

A primeira etapa deste trabalho contemplou a análise química dos polissacarídeos que compõem, em parte, a quebra-pedra (*P. niruri*). Esta segunda etapa do trabalho tem por objetivo avaliar possíveis respostas biológicas envolvendo estes metabólitos primários. Refletindo sobre que molécula utilizar na realização dos testes biológicos, optou-se por dar início ao estudo com as arabinogalactanas, uma vez que esta molécula foi isolada e caracterizada das formas populares de extração (infuso e decocto). Pensando no fato de que as pessoas ao fazerem uso dos chás de quebra-pedra estarão ingerindo também esta arabinogalactana, a escolha do uso deste polissacarídeo é justificável.

Devido aos rendimentos obtidos nas diferentes formas de extrações aquosas, optou-se por utilizar a fração AG-E10, purificada e caracterizada do extrato aquoso exaustivo.

Uma vez que as arabinogalactanas são moléculas já descritas como sendo imunoestimulatórias e antitumorais (WAGNER e JORDAN, 1988; DIALLO et al., 2003; KARDOSOVÁ et al., 2004; IM et al, 2005; MORETÃO et al, 2004), e, considerando que os macrófagos estão diretamente envolvidos em processos biológicos como defesa de hospedeiro contra agentes infecciosos, respostas angiogênicas e hematopoiéticas (WING e REMINGTON, 1980; CAVAILLON, 1994; POPOV et al., 1999; VADIVELLOO et al., 2000; COOK et al., 2001) os testes de atividade biológica foram realizados em macrófagos peritoneais residentes de camundongos.

As concentrações do polissacarídeo utilizadas nos experimentos com macrófagos foram estabelecidas previamente pela determinação da citotoxicidade da arabinogalactana em macrófagos. A Figura 37 mostra os resultados obtidos para a arabinogalactana (AG-E10), testada nas concentrações de 25 a 250 µg/mL, pelo período de 2, 24 e 48 h. Os experimentos realizados por 2 e 24h não foram capazes de desencadear respostas citotóxicas em nenhuma das concentrações de AG-E10 testadas, no entanto, o ensaio em 48 h apresentou uma redução da viabilidade celular em torno de 20% na concentração de 50 µg/mL e de 35% nas concentrações de 100 a 250 µg/mL.

De posse dos resultados da viabilidade celular, foi possível determinar o efeito de AG-E10 no “burst” respiratório (Figura 38), o qual é caracterizado pelo acentuado aumento no consumo de oxigênio, resultante da ativação da NADPH oxidase, gerando um aumento na produção de ânion superóxido (O_2^-). Uma outra forma de análise do consumo de oxigênio poderia ser realizada medindo-se a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma vez que a produção de O_2^- ativa a enzima superóxido dismutase (SOD), resultando em um aumento de H_2O_2 . No entanto, optou-se por dosar a produção de O_2^- através da redução extracelular do citocromo c (SASADA, PABT e JOHNSTON, 1983).

Este experimento pôde ser realizado com as concentrações de AG-E10 de 25 a 250 µg/mL uma vez que, o tempo de incubação com o polímero é de 2h, não apresentando, portanto, toxicidade para os macrófagos. Os resultados obtidos

apresentaram um estímulo dose-dependente na da produção de O_2^- a partir da concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, alcançando o estímulo máximo de ~200% maior que o controle, na maior concentração utilizada (250 $\mu\text{g/mL}$).

Outro parâmetro avaliado para verificar os efeitos de AG-E10 sobre macrófagos peritoneais de camundongos foi em relação à produção de óxido nítrico (NO) (Figura 39). A via de produção de NO é essencial na defesa antimicrobiana, inflamação e angiogênese (MacMICKING, XIE e NATHAN, 1997). Uma vez que este experimento requer incubação de 48 h, optou-se por usar o polissacarídeo nas concentrações de 5,10 e 50 $\mu\text{g/mL}$, para evitar os efeitos citotóxicos apresentados pela molécula a partir de 50 $\mu\text{g/mL}$. Os experimentos foram realizados com o uso de interferon gama (INF- γ) e lipopolissacarídeo (LPS) como controles positivos.

A Figura 39 mostra que AG-E10 não foi capaz de promover ativação na produção de NO, em nenhuma das concentrações testadas. Associando-se a arabinogalactana ao interferon, um conhecido ativador da via, pode-se observar um discreto decréscimo da resposta em relação ao uso do interferon sozinho. Assim, este polissacarídeo não apresentou nenhuma resposta positiva de ativação desta via. Ainda, no intuito de garantir a ausência de LPS como contaminante presente na amostra testada, foi realizado um controle com polimixina B, um antibiótico conhecido pelo efeito neutralizante da resposta envolvendo LPS (CUNHA et al., 1993).

Os experimentos biológicos realizados com a amostra AG-E10, uma arabinogalactana ácida e de estrutura complexa, presente nos chás de quebra-pedra (*P. niruri*) indicaram que este polissacarídeo apresentou um estímulo da produção do O_2^- , de maneira dose-dependente, com um estímulo máximo de 200% a mais que o controle na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$. Este é um resultado muito interessante tendo em vista que é o primeiro relato deste tipo de resposta observada para os extratos já testados com a planta. Em contrapartida, o estudo realizado por IGNÁCIO e colaboradores (2001) demonstrou que os extratos aquoso e acetônico de *P. tenellus* apresentaram um aumento na produção de NO. Os autores identificaram a presença de flavonoides, elagitânicos e compostos fenólicos em ambos os extratos e acreditam que estes componentes podem participar de tal atividade. Já o experimento realizado com a

arabinogalactana não apresentou resposta nesta via de ativação de macrófagos, não participando do efeito biológico previamente realizado.

Este trabalho ainda contempla experimentos de ativação de macrófagos após degradação parcial de AG-E10. Estes resultados serão discutidos à parte, no item 5.3.

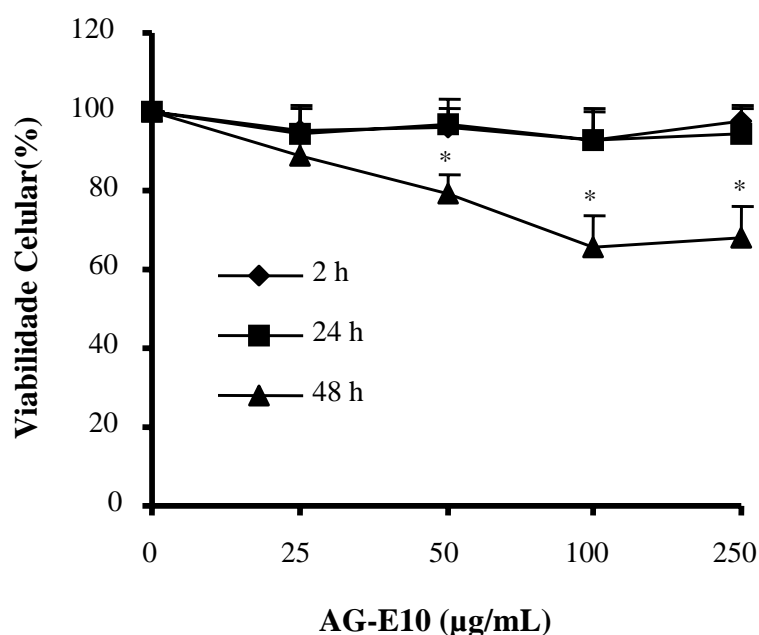


Figura 37 - Efeitos de AG-E10 na viabilidade de macrófagos.

Macrófagos aderidos foram incubados em diferentes concentrações de AG-E10 nos tempos indicados. O meio foi removido e o MTT adicionado, seguido de incubação de 3 h. O excesso de MTT foi removido e os cristais de formazan, dissolvidos em DMSO. A leitura da absorbância foi em 550 nm. Os valores representam a média (\pm DP) de três experimentos independentes, cada um em triplicata. * Diferença significativa para o controle; $p < 0,05$. Controle (100%) corresponde ao meio na ausência de AG-E10. (◆) 2 h, (■) 24 h e (▲) 48 h de exposição à AG-E10.

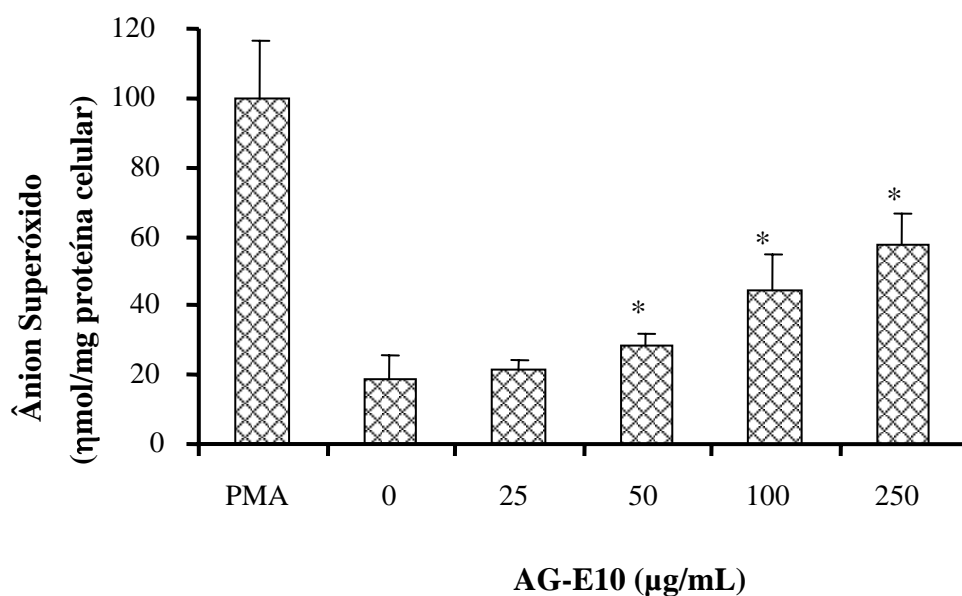


Figura 38 – Efeitos de AG-E10 na produção de ânion superóxido por macrófagos. Macrófagos aderentes foram incubados com HBSS contendo ferricitocromo c ($80 \mu\text{M}$) e diferentes concentrações de AG-E10 nas concentrações indicadas. PMA ($1 \mu\text{g/mL}$) foi usado como controle positivo. Após 2 h, o sobrenadante foi removido e a absorbância medida em 550 nm. Os resultados são expressos em nmol de ânion superóxido/mg de proteína celular. Os valores representam a média (\pm DP) de três experimentos independentes, cada um em triplicata. * Significativamente diferente dos experimentos realizados na ausência de AG-E10 (controle negativo); $p < 0,05$.

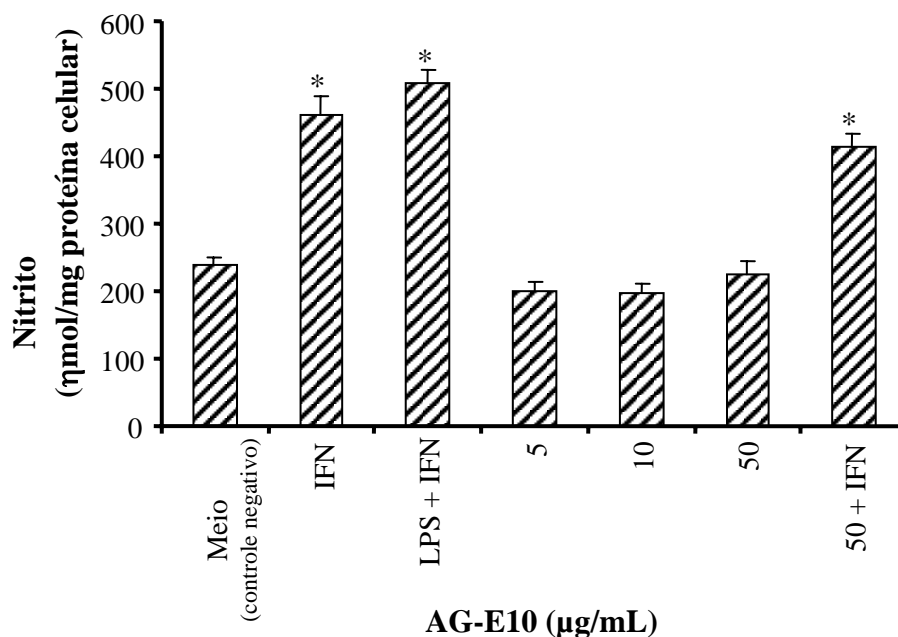


Figura 39 – Efeitos de AG-E10 na produção de óxido nítrico por macrófagos. Macrófagos aderentes foram incubados por 48 h na ausência (controle negativo) e presença de AG-E10. LPS (50 µg/mL) e IFN- γ (26 U/mL) foram usados como controles positivos. O acúmulo de NO foi medido no sobrenadante, usando a reação de Griess e calculado como nmol nitrito/mg proteína celular. AG-E10 foi incubada na ausência e presença de IFN- γ (26 U/mL). Os valores representam a média (\pm DP) de quatro independentes experimentos, cada um em triplicata. * Significativamente diferente do controle (meio); $p < 0,05$.

Considerando a baixa toxicidade de AG-E10 *in vitro* e o alto percentual de ativação de macrófagos peritoneais verificado pelo aumento na produção de O_2^- , a avaliação da atividade *in vivo* desta macromolécula passa a ser interessante. Optou-se por dar início à averiguação avaliando a capacidade dessa arabinogalactana em elicitar células para a cavidade peritoneal de camundongos quando injetada intraperitonealmente. O polissacarídeo foi inoculado intraperitonealmente nas doses de 50, 100 e 200 mg.kg⁻¹ de AG-E10 nos animais testados. Após 24 h da inoculação do polissacarídeo, os animais foram sacrificados e os macrófagos do exsudato peritoneal foram contados. Os resultados apresentados na Figura 40 demonstraram que nas doses de 100 e 200 mg.kg⁻¹ houve um aumento significativo do número

células. Na dose de 100 mg.kg⁻¹ houve um aumento de 230% no recrutamento das células, enquanto na dose de 200 mg.kg⁻¹ esse aumento passou para 180%. Estes resultados são muito interessantes se comparados com outros estudos envolvendo este tipo de atividade em arabinogalactanas, como por exemplo, a arabinogalactana obtida de *Anadenanthera colubrina* que apresentou um aumento de 88% do número de células da cavidade peritoneal (MORETÃO et al., 2003), enquanto o polissacarídeo isolado de *Feronia limonia* apresentou um aumento de 56% de células (SAIMA et al., 2000).

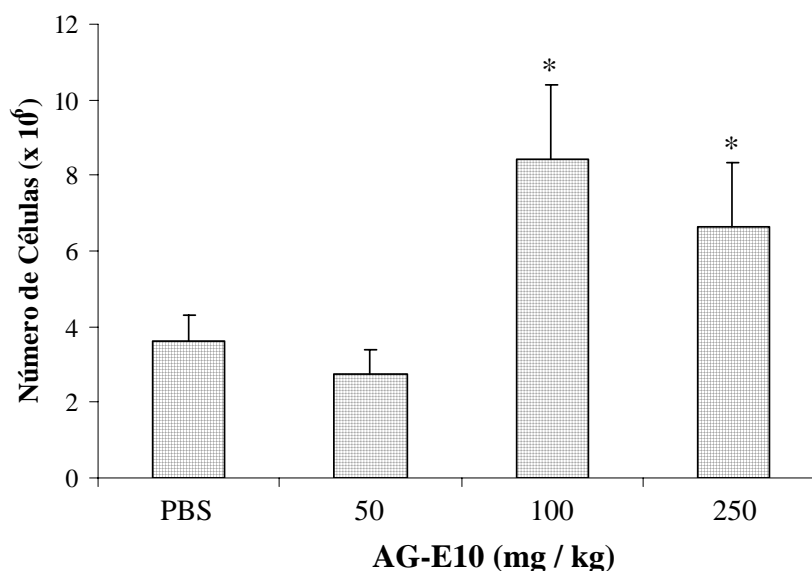


Figura 40 - Avaliação da atividade elicitora de AG-E10.

Camundongos (n=4 por grupo) foram inoculados intraperitonealmente com AG-E10 nas concentrações indicadas. O grupo controle foi inoculado com PBS estéril. Após 24 h, as células do exsudato peritoneal de cada grupo foram coletadas e contadas em câmara de Neubauer. Os valores representam a média (\pm DP) de quatro experimentos independentes, cada um em triplicata. * Significativamente diferente do controle (animais inoculados com PBS); $p < 0,05$.

5.3 COMPORTAMENTO POLISSACARÍDICO EM CONDIÇÃO FISIOLÓGICA GÁSTRICA

Esta terceira etapa do trabalho teve por objetivo avaliar o comportamento polissacarídico no processo parcial da digestão. Partindo do fato de que uma arabinogalactana ácida, isolada e caracterizada a partir dos extratos aquosos de *P. niruri*, está presente nos chás (infuso e decocto) da planta e que esta molécula apresentou uma atividade estimulatória da produção de ânion superóxido quando testada *in vitro* em macrófagos peritoneais de camundongos, optou-se por avaliar as alterações químicas desta molécula após o processo de digestão gástrica, inferindo assim, em como esta molécula estaria disponível no organismo.

Tendo em vista as etapas do processo digestivo como um todo e as funções de cada órgão digestivo, optou-se por restringir esta avaliação às condições gástricas, pois é no estômago que os polissacarídeos não-amídicos poderiam sofrer algum tipo de alteração estrutural e/ou conformacional já que não dependem de sistemas enzimáticos específicos, mas da força ácida gerada pela presença de ácido clorídrico. Segundo HOEBLER (2002) o estômago é a fase chave do processo digestivo, uma vez que esta etapa determina as alterações químicas e mecânicas do alimento, preparando-o para a digestão e absorção de nutrientes.

O processo de liberação de HCl no estômago é bem regulado pelo organismo e um descontrole neste processo pode gerar diversas patologias, inclusive gastrite e úlceras. No período interdigestivo, àquele no qual o estômago encontra-se vazio, ocorre um tamponamento do HCl remanescente para evitar a acidez excessiva sobre a mucosa gástrica, elevando o pH estomacal para valores levemente alcalinos (~7,4). A secreção gástrica de HCl não se inicia somente no momento da ingestão de alimentos, mas ao visualizar, cheirar ou lembrar de alimentos; assim, o estômago encontra-se preparado para receber o alimento em si. Esta etapa prévia de liberação de HCl à ingestão do alimento é denominada fase cefálica da secreção gástrica e pode ser induzida pelo processo chamado de “alimentação fantasma”, no qual o indivíduo entra em contato com o alimento, mas não o ingere. Nesta etapa, o pH estomacal diminui

drasticamente, chegando a 0,8 (AIRES, 1999). Assim que ocorre o esvaziamento gástrico, o processo de tamponamento é reiniciado.

Esta etapa do trabalho foi então realizada coletando-se o suco gástrico de voluntários submetidos e não submetidos ao processo de “alimentação fantasma”, além de realizá-lo com HCl (pH 2,0) para fins comparativos. O suco gástrico foi coletado conforme a Figura 40 e os resultados experimentais, obtidos por análise em HPLC, após incubar a amostra com o agente hidrolizante (sucos gástricos ou HCl) a 37 °C por 180 minutos estão apresentados nas Figuras 41 a 43.

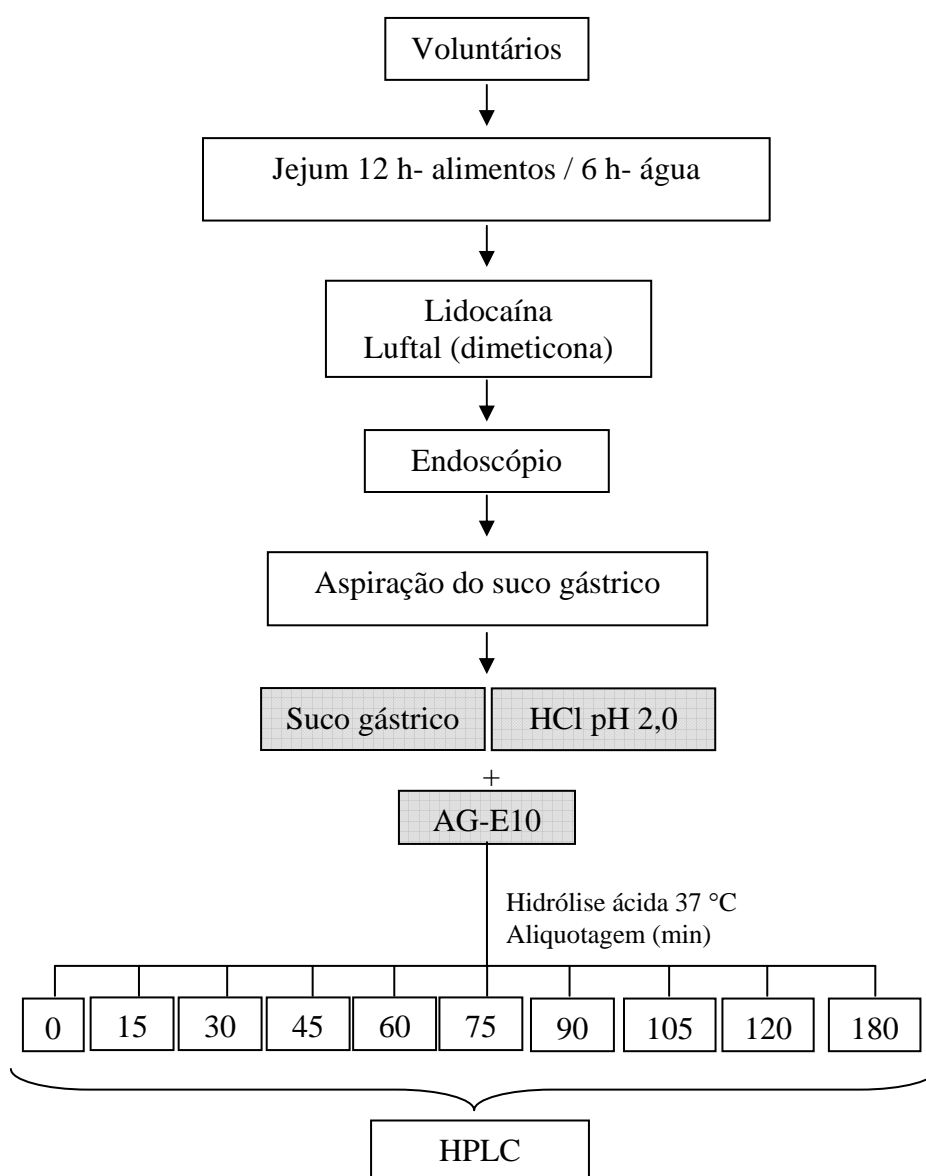


Figura 41 – Processos de obtenção do suco gástrico e de hidrólise de AG-E10 em meio ácido.

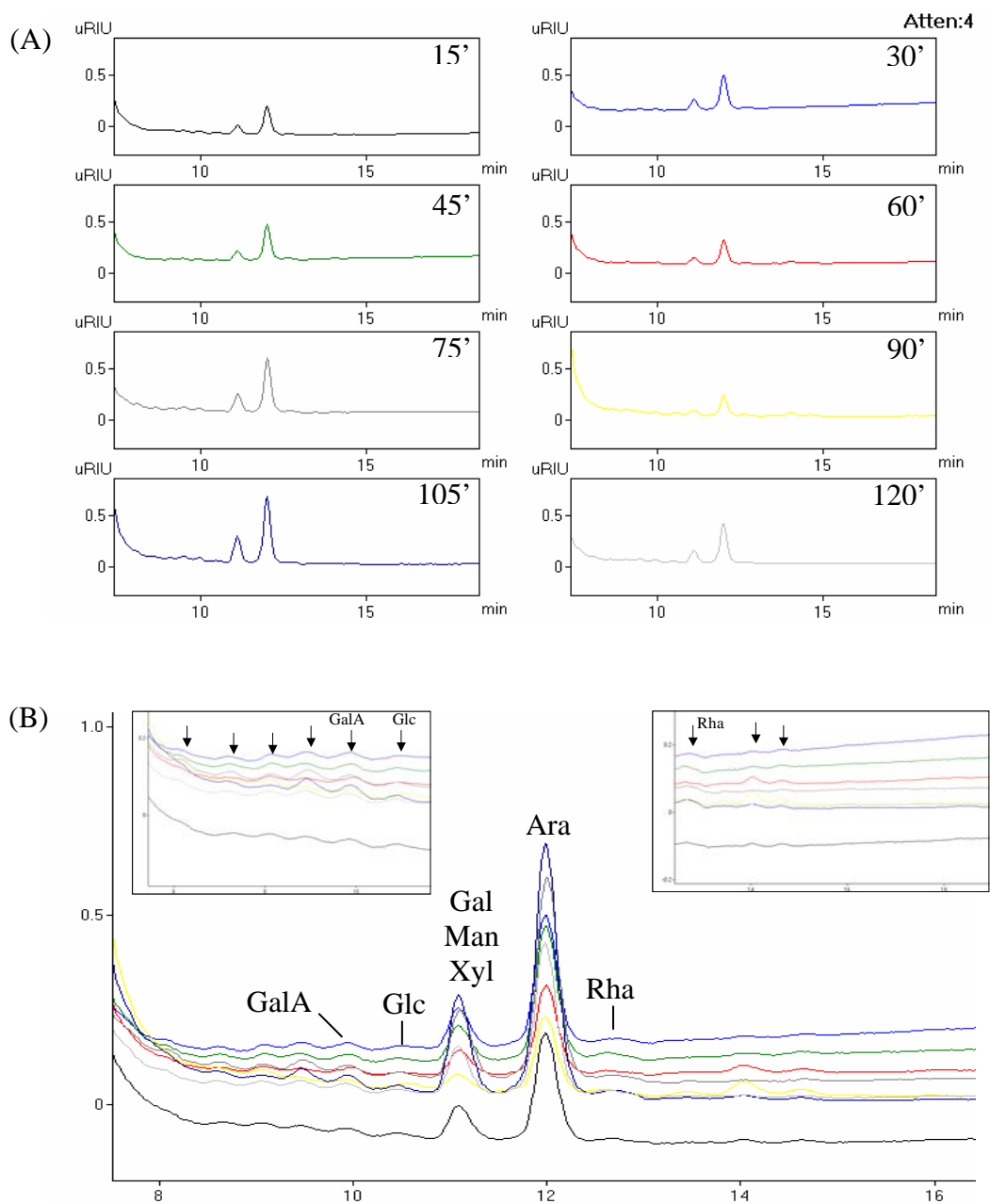


Figura 42 – Cromatogramas obtidos em HPLC de AG-E10 submetida à hidrólise ácida com HCl (pH =2,0). (A) Perfis cromatográficos em diferentes tempos e (B) Sobreposição dos cromatogramas obtidos em diferentes tempos. Os inserts apresentam um aumento no foco do cromatograma no início e final da corrida.

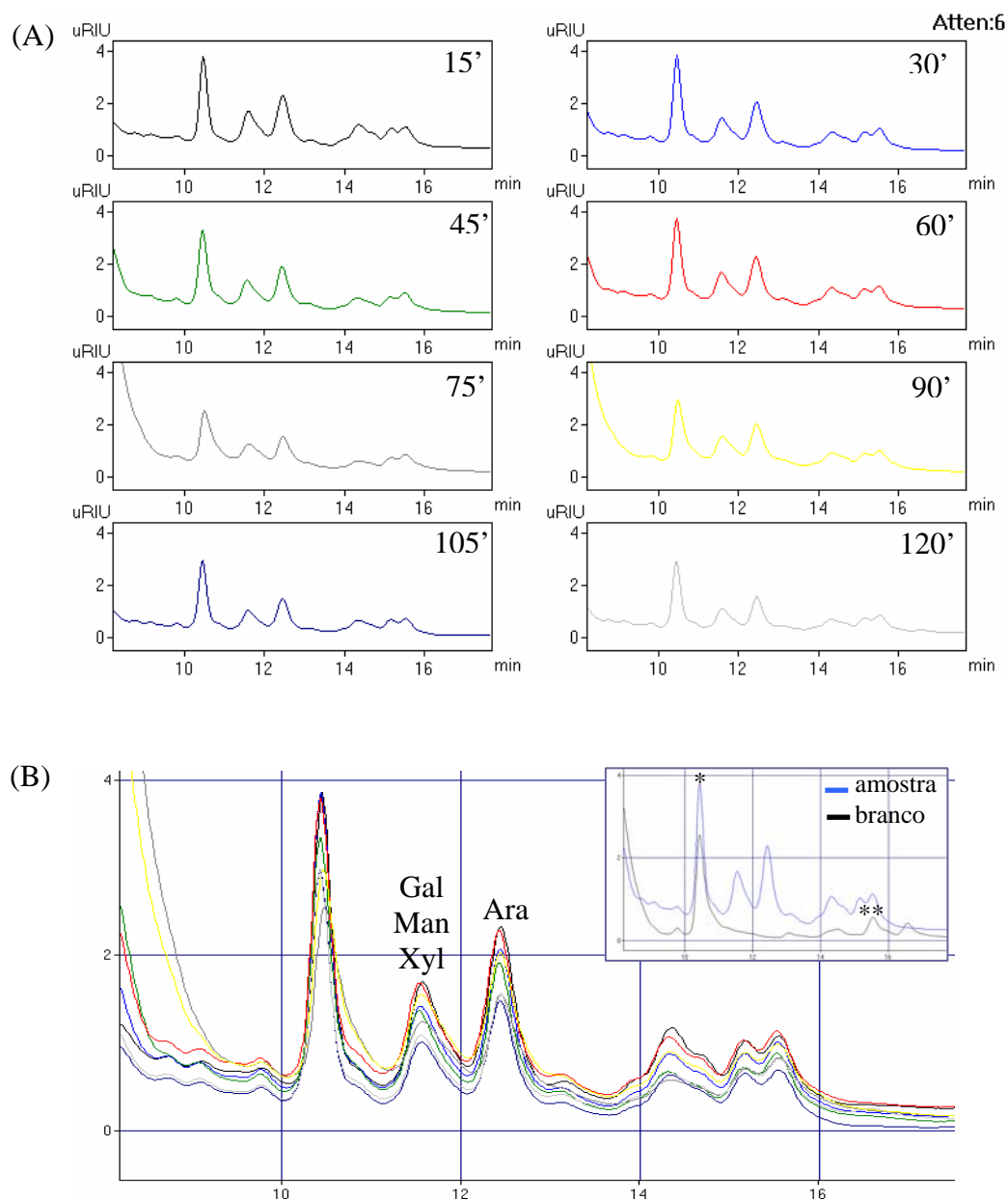


Figura 43 – Cromatogramas obtidos em HPLC de AG-E10 submetida à hidrólise ácida com suco gástrico pH 1,95 (voluntário submetido ao processo de “alimentação fantasma”). (A) Perfis cromatográficos em diferentes tempos e (B) Sobreposição dos cromatogramas obtidos em diferentes tempos. Inserto: Sobreposição dos perfis de eluição da amostra e do suco gástrico usado como o branco da análise. * Lidocaína, ** Dimeticona.

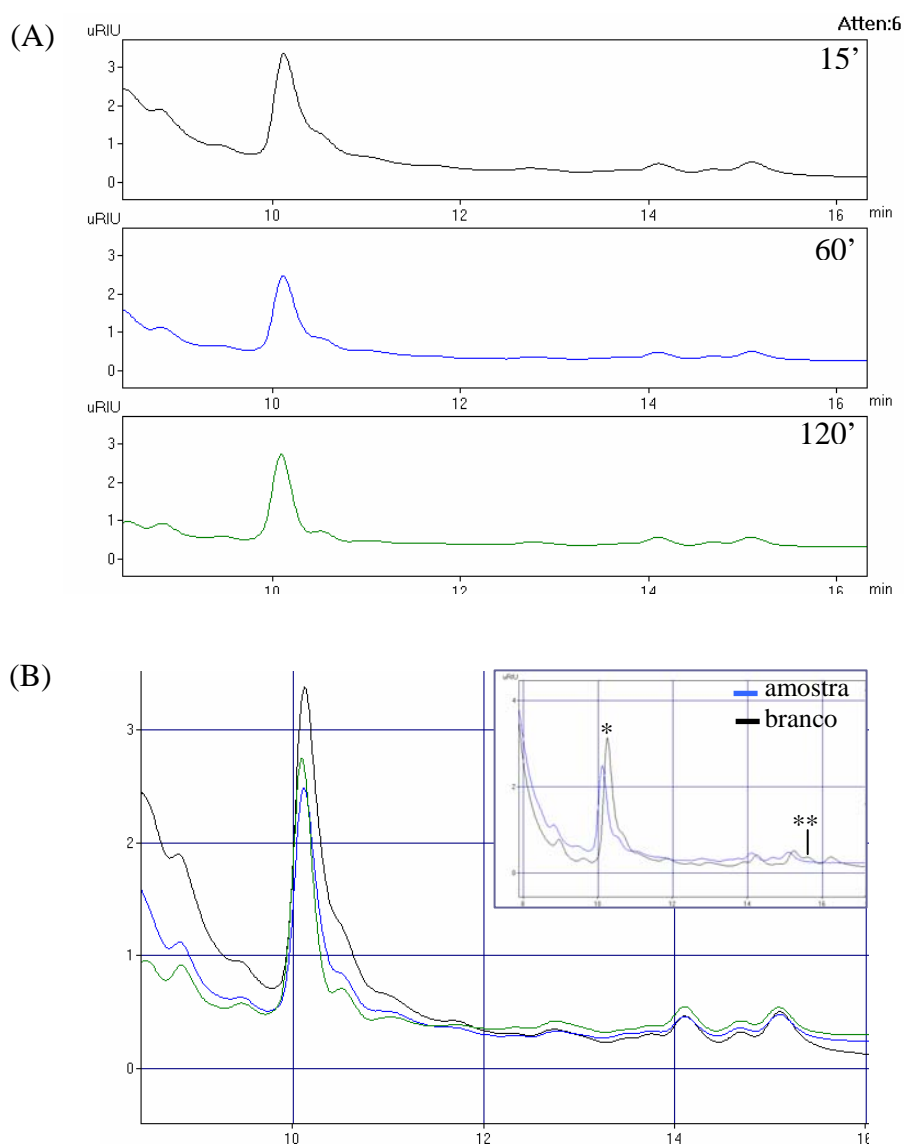


Figura 44 – Cromatogramas obtidos em HPLC de AG-E10 submetida à hidrólise com suco gástrico pH 7,76 (voluntário não submetido ao processo de “alimentação fantasma”). (A) Perfis cromatográficos em diferentes tempos e (B) Sobreposição dos cromatogramas obtidos em diferentes tempos. Inseto: Sobreposição dos perfis de eluição da amostra e do suco gástrico usado como o branco da análise. * Lidocaína, ** Dimeticona.

A Figura 42 mostra os resultados obtidos ao submeter a amostra AG-E10 à hidrólise ácida com HCl em pH =2,00. Em (A) são mostrados os cromatogramas obtidos nos diferentes tempos de alíquotagem (em minutos). Ao sobrepor estes cromatogramas (Figura 42-B), pode-se observar um mesmo perfil para a amostra em todos os tempos analisados. De acordo com o tempo de retenção dos padrões utilizados, foi possível identificar um pico maior indicando a presença de arabinose e um pico menor, indicando a presença de manose, galactose e/ou xilose. Estes picos não puderam ser resolvidos por uma incapacidade da coluna utilizada, indicando, portanto, a presença de um ou mais destes monossacarídeos. Foi ainda detectada a presença de outros picos menores, indicando a presença de ácido galacturônico, glucose e ramnose. Ampliando as regiões que precedem e sucedem os picos referentes aos monossacarídeos foi também possível observar outros picos que poderiam estar relacionados com a presença de oligossacarídeos.

Ao analisar os resultados obtidos com o experimento realizado em suco gástrico pH 1,95 (Figura 43), também foi possível observar a presença de dois picos maiores indicando a presença de arabinose e manose, galactose e/ou xilose, da mesma forma em que foi observado no experimento com HCl. Devido ao perfil cromatográfico do próprio suco gástrico, não foi possível identificar a presença dos outros monossacarídeos. Os perfis cromatográficos nos diferentes tempos também se apresentaram iguais, como o encontrado no experimento anterior.

Já o experimento realizado com o suco gástrico em pH 7,76, sem prévia “alimentação fantasma” (Figura 44), apresentou um perfil cromatográfico bem distinto dos experimentos anteriores, não havendo hidrólise do polissacarídeo, uma vez que o perfil cromatográfico coincidiu com o perfil do suco gástrico em todos os tempos analisados. Desta forma, foi possível demonstrar que o polissacarídeo AG-E10 sofreu um certo grau de hidrólise ao ser submetido à pHs ácidos, processo não verificado em pH alcalino, demonstrando que, realmente, a força ácida do HCl é o fator gerador das alterações químicas sofridas pela molécula, como descrito por ZHANG e colaboradores (2003). Esses autores observaram que ao diminuir o pH da

solução de HCl, ocorreu maior liberação de unidades de arabinose de arabinosilanas e de arabinogalactanas de vegetais.

Sabendo que AG-E10 sofreu alterações estruturais após ser submetida ao tratamento ácido, mimetizando as condições estomacais, os próximos experimentos foram realizados com o intuito de verificar quais seriam estas alterações através de análises químicas, como análise do perfil de homogeneidade, composição monossacarídica e ^{13}C -RMN. Para tal, 60 mg de AG-E10 foi novamente submetida à hidrólise ácida com HCl pH 2,00. O polissacarídeo foi então fracionado por meio de precipitação em etanol, separando os fragmentos de alta (AG-E10P) e baixa massa molar (AG-E10S) (Figura 45). A amostra AG-E10S rendeu 27 mg (45%), enquanto AG-E10P rendeu 17 mg (28,3%).

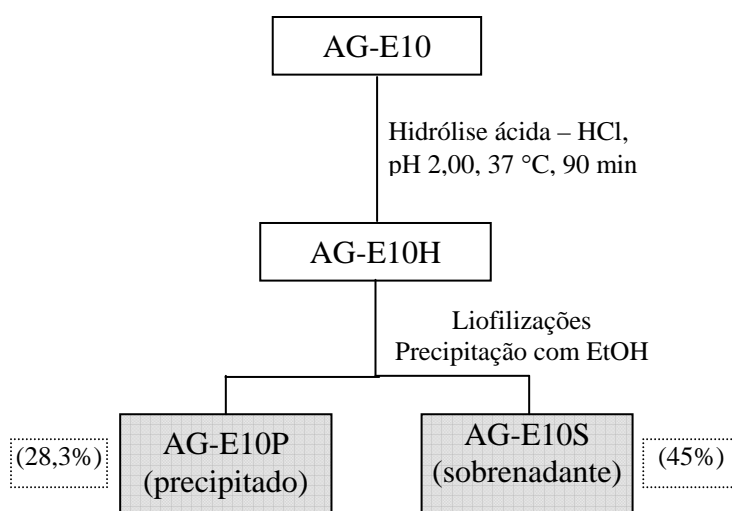


Figura 45 – Fluxograma de hidrólise ácida em HCl e fracionamento etanólico de AG-E10.

Analisando os perfis de homogeneidade da arabinogalactana nativa e das frações do polissacarídeo degradado (Figura 46), pode-se observar que houve, de fato, uma alteração significativa na molécula, em que foram gerados diversos picos na análise, sugerindo, portanto, que a digestão estomacal, não só é capaz de fazer um “peeling” na molécula, como também é capaz de fragmentá-la. É interessante observar que os perfis de eluição tanto do sobrenadante quanto do precipitado

etanólico apresentaram-se similares, no entanto, o sobrenadante apresentou picos de maior intensidade em tempos de eluição posteriores, indicando a presença de uma maior concentração de fragmentos moleculares de menor massa molar. O oposto foi verificado para o precipitado etanólico, indicando a presença de fragmentos moleculares de maior massa molar.

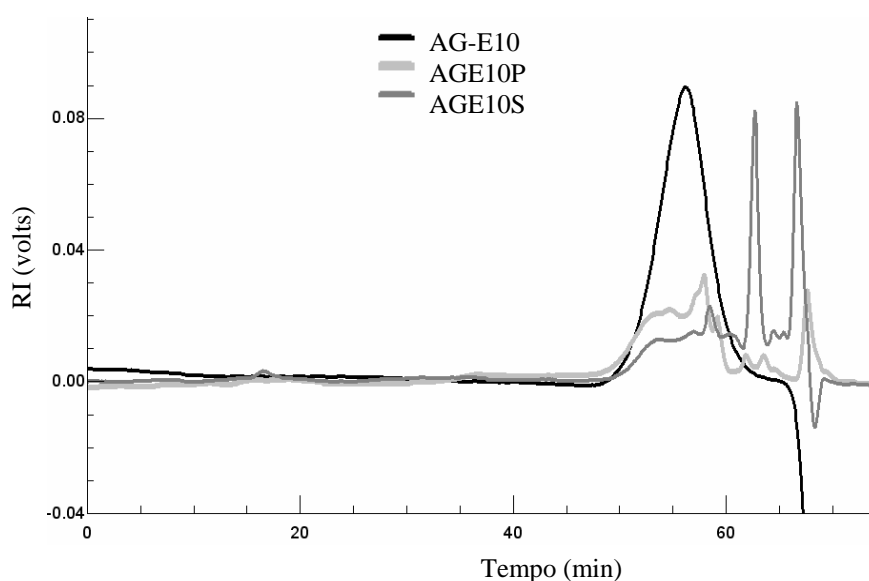


Figura 46 – Perfis de eluição da arabinogalactana nativa e degradada analisadas em HPSEC. Solvente: NaNO_2 , $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Dando continuidade às análises comparativas entre a arabinogalactana nativa e suas frações de degradação, foram analisadas as composições monossacarídicas destas amostras (Tabela 10) e pôde-se observar que o sobrenadante etanólico (AG-E10S) apresentou 3,5 vezes mais arabinose que o precipitado (AG-E10P), enquanto AG-E10P apresentou 2 vezes mais manose e 2,4 vezes mais glucose que AG-E10S. Estes dados demonstram que grande parte da arabinose, por ser terminal não-redutor, é extraída da molécula como unidades monossacarídicas ou como oligossacarídeos. Já a manose e a glucose são mais internas à molécula e são extraídas em fragmentos moleculares de maior massa molar. Ainda foram observados altos percentuais de galactose em ambas as amostras degradadas, indicando fragmentações na cadeia principal, já que a maior parte da galactose encontra-se na cadeia principal (2,3,6-

Me₃-Gal, 36%; ver Tabela 04, p.71). Apesar de não ter sido dosada a quantidade de ácido urônico na amostra, foi possível detectar a presença deste na análise por HPLC (Figura 42).

Tabela 10 - Composição monossacarídica da arabinogalactana nativa e frações degradadas.

Amostra	Composição Monossacarídica (mol%) ^a						
	Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	AU ^b
AG-E10	8	35	9	4	21	8	15
AG-E10S	7	28	8	9	36	12	nd ^c
AG-E10P	9	8	3	18	33	29	nd ^c

^a analisados em GC-MS, na forma de alditóis acetato, coluna OV-225, temperatura 40-220°C.

^b ácidos urônicos.

^c não determinado.

O espectro de ¹³C-RMN de AG-E10S (Figura 47-B) confirma a presença do aumento de unidades redutoras presentes na amostra, pois houve um aumento significativo de sinais na região entre δ 96 e 92, sinais que ao serem comparados com oligossacarídeos caracterizados por DELGOBO e colaboradores (1998) podem indicar a presença de C-1 de α- e β-Galp, respectivamente. A região anomérica ainda contém assinalamentos referentes às unidades de β-Galp (δ 103,2), α-Glcp ou β-GalpA (δ 101,3), α-Rhap (δ~ 99) e α-GalpA (δ~ 98) (DELGOBO et al., 1998). Ao comparar AG-E10S com o espectro da arabinogalactana nativa (A), pode-se observar um maior grau de complexidade no espectro, não só na região anomérica, como também para os outros carbonos. Assim como na amostra nativa, foi também observado um sinal intenso em δ 16,4 caracterizando os grupamentos –CH₃ das unidades de α-Rhap. Um sinal de baixa resolução na região ~ δ 175 também foi observado, indicando a presença de grupamentos –COOH do ácido galacturônico.

Este é mais um dado que indica o processo digestivo como sendo capaz de fragmentar a molécula, já que o ácido galacturônico está ligado às unidades de ramnopirranose, componente péctico da arabinogalactana.

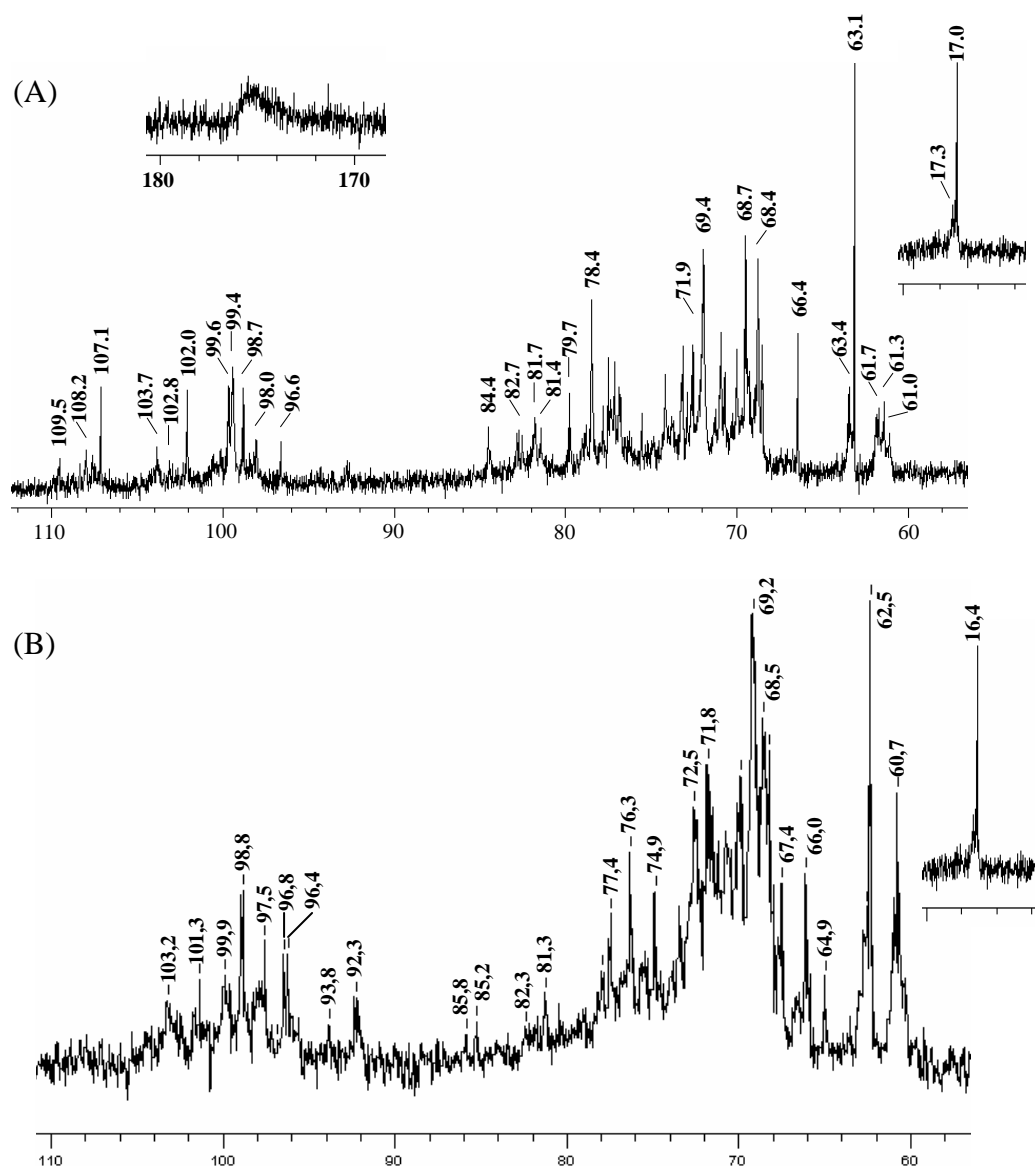


Figura 47 – Espectros de ^{13}C -RMN de (A) AG-E10 e (B) AG-E10S. Experimento realizado em D_2O , 50°C . Valores expressos em δ (ppm).

A análise espectroscópica do precipitado etanólico (AG-E10P) não apresentou resultado satisfatório, pois após o processo de degradação parcial, esta fração passa a ser parcialmente insolúvel, tanto em água e álcali como em DMSO.

As análises químicas realizadas para a arabinogalactana após degradação parcial em meio ácido, mimetizando as condições estomacais demonstraram que a molécula é, de fato, parcialmente degradada. Este dado é de grande interesse para a literatura da área, pois os trabalhos realizados com digestão de polissacarídeos afirmam, até a presente data, que a digestão em si só ocorre no intestino delgado, por meio de fermentação bacteriana (BACH KNUDSEN, 2001; AIRES, 1999; BACH KNUDSEN, 1993; GLITSO et al., 1998).

Por fim, a pergunta ainda permanece: Esta arabinogalactana, após ser ingerida nos chás de quebra-pedra e ser parcialmente degradada, apresenta alguma função biológica? Para responder a esta pergunta, as frações AG-E10S e AG-E10P foram submetidas às mesmas análises, nas mesmas condições, da arabinogalactana nativa (AG-E10). O primeiro experimento realizado foi o de viabilidade celular (Figura 48), para se saber quanto à citotoxicidade das frações. Os resultados apresentados são referentes a 48 h de incubação, e nenhuma das frações alterou a viabilidade dos macrófagos peritoneais de camundongos. Este dado difere do polissacarídeo nativo, pois AG-E10 apresentou redução de viabilidade celular a partir de 50 µg/mL (Figura 37), o que sugere que, de alguma forma, o tamanho, a conformação e/ou a sequência de monossacarídeos no polissacarídeo são importantes na determinação da toxicidade em macrófagos.

O experimento envolvendo a produção de NO foi realizado com as frações entre 25 e 250 µg/mL (Figura 49) e os resultados mostraram que, independente da concentração, ambas as frações não apresentaram qualquer efeito positivo, dado igual ao encontrado para a amostra nativa, indicando que este polissacarídeo, bem como seus fragmentos moleculares não atuam na via de produção de NO.

Já o experimento realizado para verificar a produção de O_2^- , utilizando as frações a 25, 50, 100 e 250 µg/mL (Figura 50) mostrou dados de ativação desta via. A arabinogalactana nativa apresentou uma ativação de 3 vezes, enquanto a fração

AG-E10S apresentou uma ativação de 0,9 vezes com 100 $\mu\text{g/mL}$ e 2 vezes com a dose máxima utilizada, mostrando um efeito dose-dependente, no entanto, menor do que aquele observado para o polissacarídeo nativo. A amostra AG-E10P apresentou um efeito ativador de 2 vezes com 100 $\mu\text{g/mL}$ e 2,3 vezes com a dose máxima utilizada. Este efeito também foi dose-dependente e, apesar de menor em relação ao polímero nativo, o precipitado etanólico apresentou uma maior atividade em relação ao sobrenadante. Este dado indica que, de alguma maneira, existe uma relação entre a estrutura da arabinogalactana e a resposta biológica observada, em que o tamanho dos fragmentos moleculares, bem como a conformação que estes assumem em solução e/ou a sequência dos monossacarídeos nestes fragmentos devem estar diretamente relacionados com a atividade relatada.

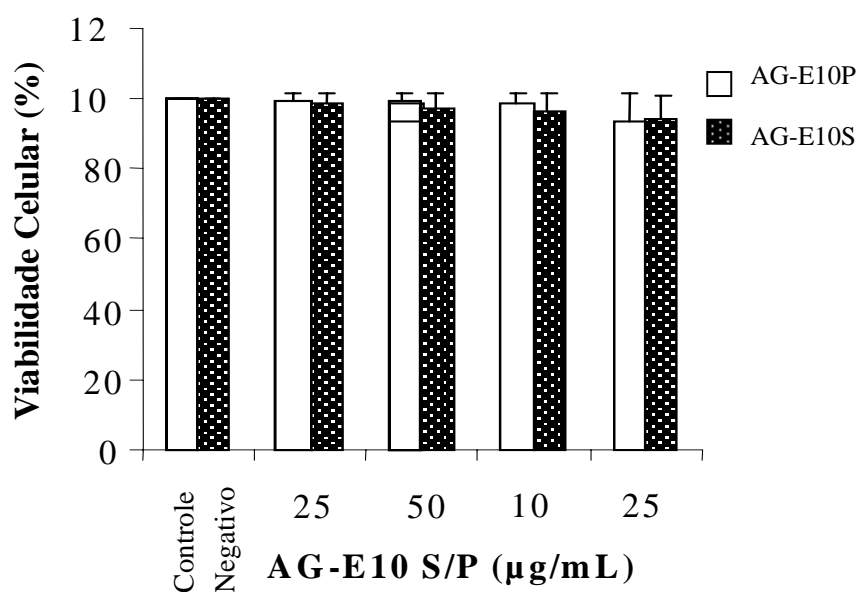


Figura 48 - Efeitos de AG-E10S e AG-E10P na viabilidade de macrófagos. Macrófagos aderidos foram incubados em diferentes concentrações de AG-E10S e AG-E10P. O meio foi removido e o MTT adicionado, seguido de incubação de 3 h. O excesso de MTT foi removido e os cristais de formazan, dissolvidos em DMSO. A leitura da absorbância foi em 550 nm. Os valores representam a média (\pm DP) de três experimentos independentes, cada um em triplicata. * Diferença significativa para o controle; $p < 0,05$. Controle (100%) corresponde ao meio na ausência de carboidratos.

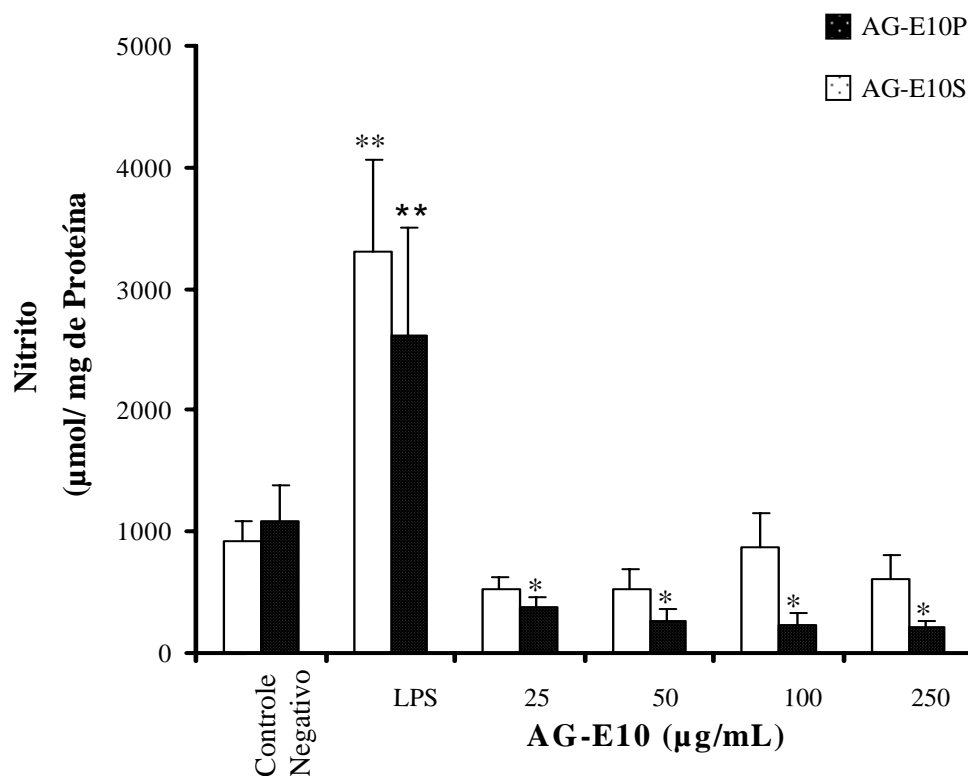


Figura 49 – Efeitos de AG-E10S e AG-E10P na produção de óxido nítrico por macrófagos.

Macrófagos aderentes foram incubados por 48 h na ausência (controle negativo) e presença de AG-E10S e AG-E10P. LPS (50 µg/mL) e IFN-γ (26 U/mL) foram usados como controles positivos. O acúmulo de NO foi medido no sobrenadante, usando a reação de Griess e calculado como nmol nitrito/mg proteína celular. As amostras foram incubadas na ausência e presença de IFN-γ (26 U/mL). Os valores representam a média (\pm DP) de quatro experimentos independentes, cada um em triplicata.

* Significativamente diferente do controle negativo; $p < 0,05$. ** Controle positivo da via. Significativamente diferente dos resultados obtidos para as amostras; $p < 0,05$.

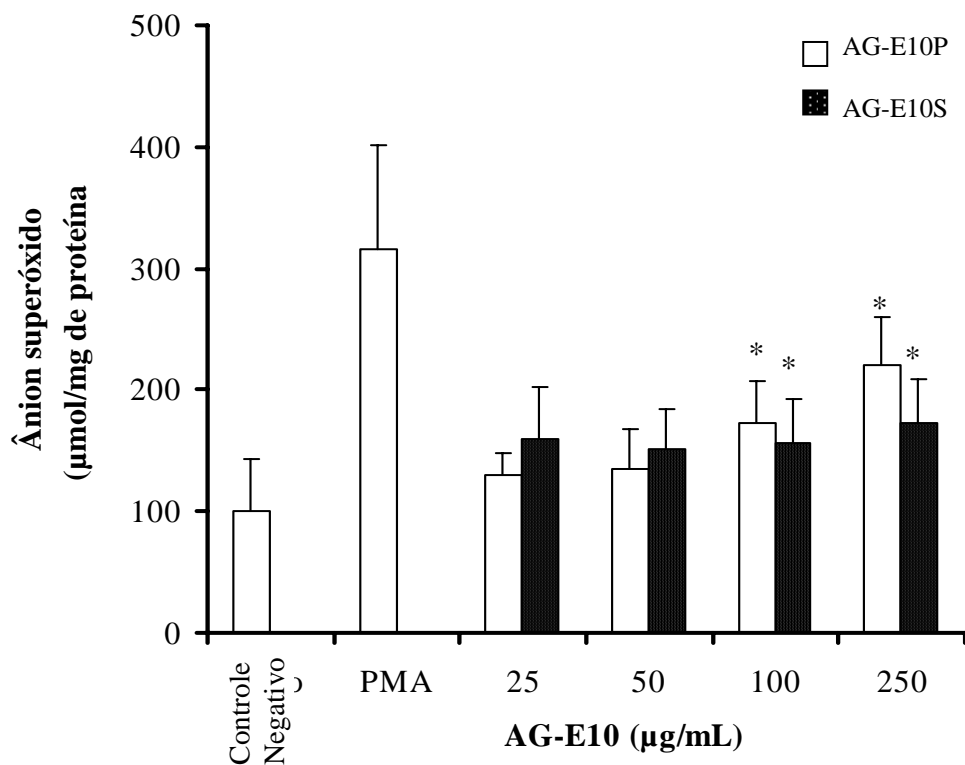


Figura 50 – Efeitos de AG-E10S e AG-E10P na produção de ânion superóxido por macrófagos.

Macrófagos aderentes foram incubados com HBSS contendo ferricitocromo c (80 µM) e diferentes concentrações de AG-E10S e AG-E10P. PMA (1 µg/mL) foi usado como controle positivo. Após 2 h, o sobrenadante foi removido e a absorbância medida em 550 nm. Os resultados são expressos em nmol de ânion superóxido/mg de proteína celular. Os valores representam a média (\pm DP) de três experimentos independentes, cada um em triplicata. * Significativamente diferente dos experimentos realizados na ausência de AG-E10S e AG-E10P (controle negativo); $p < 0,05$.

6 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O uso de plantas medicinais como forma de tratamento de diversas patologias é uma crescente mundial e, com este aumento do uso da fitoterapia, surgiu também a necessidade de se investigar os componentes químicos e os papéis biológicos que estes poderiam estar desempenhando no organismo do homem.

Hoje, a literatura científica traz mais de uma centena de trabalhos publicados em periódicos internacionais de qualidade reconhecida sobre os componentes presentes em espécies do gênero *Phyllanthus* e suas propriedades biológicas. Até a realização deste trabalho, nenhum relato havia sido publicado sobre carboidratos de *Phyllanthus* sp.

Sabendo da diversidade molecular que compõem os extratos vegetais consumidos pela população que faz uso de plantas medicinais, este estudo pôde contribuir de forma significativa trazendo à tona uma classe de biomoléculas que, além de representar uma fonte de obtenção de energia, apresenta também papéis biológicos já consagrados na literatura mundial. Os carboidratos, mais especificamente, os polissacarídeos, foram objeto de estudo sob diferentes aspectos: químico, biológico e fisiológico.

A abordagem química apresentou a caracterização estrutural de algumas destas macromoléculas que compõem a parede celular da planta. Já a abordagem biológica demonstrou as respostas de ativação de macrófagos peritoneais de camundongos frente ao uso de um polissacarídeo encontrado nos chás de quebra-pedra. Por fim, a abordagem fisiológica apresentou características químicas e biológicas das sub-frações deste polissacarídeo resultante de uma hidrólise ácida, mimetizando condições gástricas. Assim, da mesma maneira que alguns questionamentos iniciais (como, por exemplo: 1- quais carboidratos estariam presentes nos chás da planta, 2- os polissacarídeos são extraídos mesmo sendo branda a força de extração usada nos infusos e decoctos, 3- existe alguma atividade biológica que pode ser atribuída aos carboidratos deste vegetal, 4- como se comportam estas moléculas ao serem ingeridas via oral, etc.) puderam ser respondidos acerca de carboidratos de quebra-pedra, uma

série de outras perguntas permanecem, esperando que esta ciência continue sendo investigada com o objetivo final de atender as necessidades de conhecimento e uso racional de plantas medicinais e produtos fitoterápicos.

7 CONCLUSÕES

- Os chás de *P. niruri* nas formas de infusão e decocção, assim como o extrato aquoso obtido após extração exaustiva apresentaram como componente solúvel uma arabinogalactana ácida do tipo I, de estrutura complexa;
- O extrato alcalino à quente de *P. niruri*, obtido com KOH 2%, apresentou como componente solúvel uma heteroxilana ácida, também de estrutura complexa;
- Os extratos aquosos hidrossolúveis dos órgãos vegetais, estudados em separado (folhas, caules e raízes), apresentaram polissacarídeos da classe das arabinogalactanas;
- Os extratos alcalinos à quente hidrossolúveis dos órgãos vegetais, obtidos com KOH 2%, apresentaram diferenças quanto ao componente polissacarídico, sendo a amostra da folha constituída por uma arabinogalactana péctica, enquanto as amostras do caule e raiz, constituídas por heteroxilanas similares àquela caracterizada na planta inteira;
- Os extratos alcalinos solúveis em DMSO, obtidos dos órgãos vegetais quando extraídos com NaOH 15% à quente, também apresentaram diferenças quanto ao polissacarídeo que os compõem: a fração da folha pode ser composta por xilanas substituídas e/ou xiloglucanas, enquanto as frações do caule e raiz são constituídas por xilanas pouco substituídas;
- A arabinogalactana ácida do tipo I, isolada e caracterizada dos extratos aquosos de *P. niruri* foi testada em macrófagos peritoneais de camundongos e não apresentou citotoxicidade nas doses entre 25 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ nos tempos de incubação de 2 e 24 h. Já no tempo de incubação de 48 h, a amostra diminuiu a viabilidade celular a partir de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, chegando a uma diminuição de 35% nas doses de 100 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$;
- A arabinogalactana ácida do tipo I foi capaz de estimular, de maneira dose-dependente, a produção de O_2^- a partir de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (1,5 vezes), chegando a um estímulo de 2 vezes a mais que o controle na concentração de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$;
- A arabinogalactana também promoveu uma atividade elicitora de células ao tratar os animais com o polissacarídeo por 24 h, alcançando um aumento máximo de células no exudato peritoneal de 2,3 vezes superior ao controle na dose de 100 mg.kg^{-1} ;

- A mesma arabinogalactana ácida do tipo I foi parcialmente degradada ao ser submetida à hidrólises ácidas mimetizando condições gástricas, gerando monossacarídeos e oligossacarídeos de diferentes massas molares e de diferentes composições monossacarídicas e perfis cromatográficos e espectroscópicos;
- As frações de alta (AG-E10P) e baixa massa molar (AG-E10S) desta arabinogalactana foram testadas em macrófagos peritoneais de camundongos, nas mesmas condições de teste da amostra nativa e, ambas as frações não apresentaram alteração na viabilidade de macrófagos no tempo de incubação de 48 h;
- AG-E10P e AG-E10S ativaram a produção de O_2^- , ambas de maneira dose-dependente. AG-E10P apresentou maior atividade (2,3 vezes) quando comparada à AG-E10S (2 vezes) na concentração de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Ambas frações promoveram menor atividade em relação à amostra nativa, indicando que, de maneira ainda obscura, existe uma relação estrutura/atividade a ser explorada no futuro. Imagina-se que o tamanho, a conformação e/ou a sequência monossacarídica destas moléculas possam estar envolvidas.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 3 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000, 468p.
- ABEL, G.; CZOP, J. L. Stimulation of human monocyte β -glucan receptors by glucan particles induces production of TNF- α e IL- β . **Internat. J. Immunopharmacol.**, v. 14, p. 1363-1373, 1992.
- ADACHI, Y.; OHNO, N.; YODAMAE, T. Inhibitory effects of β - glucan on zymosan-mediated hydrogen peroxide production by murine peritoneal macrophages *in vitro*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 16, p 462-467, 1993.
- ADAMS, D. O. Macrophages. **Methods Enzymol.**, v. 58, p. 494-506, 1979.

AHMAD, M.U.; HUSAIN, S.K.; OSMAN, S.M. Ricinoleic acid in *Phyllanthus niruri* seed oil. **JAOCs.**, v. 58, p.673-674, 1981.

AIRES, M. M. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p. 652-680.

ALBAN, S., SCHAUERTE, A.; FRANZ, G. Anticoagulant sulfated polysaccharides: Part I. Synthesis and structure-activity relationships of new pullulan sulfates. **Carbohydr. Polym.**, v. 47, p. 267-276, 2002.

ALBERSHEIM, P. The walls of growing plant cells. **Sci. Amer.** v. 232, p. 80-94, 1975.

ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.G.; O'NEILL, M.A.; SCHOLS, H.A.; VORAGEN, A.G.J. An hypothesis: the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. Progress in Biotechnology: **Pectins and Pectinases**. Amsterdam: Elsevier, v. 14, p. 47-55, 1996.

ASPINALL, G.O. Chemistry of cell wall polysaccharides. **The Biochemistry of Plants**. New York: Academic Press, 1980.

ASPINALL, G.O. Gums and mucilages. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 24, p. 333-379, 1969.

ASPINALL, G.O. In: **Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides**. New York: Academic Press, 1973. p. 95-115.

ASPINALL, G.O. **The Polysaccharides**. New York: Academic Press, 1982. v. 1, 503p.

AVIGAD, G.; DEY, P.M. **Plant Biochemistry**, New York: Academic Press., 1997. p. 143, 169, 177, 191-192.

BABIOR, M.B. The respiratory burst oxidase. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.**, v. 65, p.49-95, 1992.

BACH KNUDSEN, K. E.; HANSEN, I. Gastrointestinal implications in pigs of wheat and oat fractions I. Digestability and bulking properties of polysaccharides and other major constituents. **Brit. J. Nutr.**, v. 65, p. 217-232, 1991.

BACH KNUDSEN, K. E. The nutritional significance of "dietary fibre" analysis. **Animal Feed Sci. Technol.**, v. 90, p. 3-20, 2001.

BACH KNUDSEN, K. E.; JENSEN, B. B.; HANSEN, I. Digestion of polysaccharides and other major components in the small and large intestine of pigs fed diets consisting of oat fractions rich in β -D-glucan. **Br. J. Nutr.**, v. 70, p. 537-556, 1993.

BADWAY, J.A.; KARNOVSKI, M.L. Active oxygen species and the functions of phagocytic leucocytes. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 49, p. 695-726, 1980.

BANDYOPADHAY, S.K.; PAKRASHI, S.C.; PAKRASHIA. The role of antioxidant activity of *Phyllanthus emblica* fruits on prevention from indomethacin induced gastric ulcer. **J. Ethnopharmacol.**, v. 70, p. 171-176, 2000.

BELESKI-CARNEIRO, E. B.; GANTER, J. L. M. S.; REICHER, F. Structural aspects of the exudate from the fruit of *Chorisia speciosa* St Hil. **Intern. J. Biol. Macromol.**, v. 26, p. 219-224, 1999.

BERTON, G.; GORDON, S. Modulation of macrophage mannosyl-specific receptors by cultivation on immobilized zymosan. Effects on superoxide-anion release and phagocytosis. **Immunology**, v. 49, p. 705-715, 1983.

BILLIAR, T. R.; HOFMAN, R. A.; CURRAN, R. D.; LANGEHR, J. M.; SIMMONS, R. L. A role of inducible nitric oxide biosynthesis in liver, in inflammation and in the allogenic immune response. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 120, p. 192-197, 1992.

BOCHICCHIO, R.; GANTER, J. L. M. S.; REICHER, F. Isolation of hemicelluloses from the xylem of *Podocarpus lambertii*: delignification process. **Proc. Int. Symp. Nat. Polym. Comp.**, p. 189-193, 2000.

BOCHICCHIO, R.; REICHER, F. Are hemicellulose from *Podocarpus lambertii* typical of gymnosperms? **Carbohydr. Polym.**, v. 53, p. 127-136, 2003.

BODE, V.; FRANZ, G. Physiological activity of new heparinoids derived from plant polysaccharides. **Arch. Pharm.**, v. 324, p. 363-365, 1991.

BOHN, J. A.; Be MILLER, J. N. 1 →3 β-D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydr. Polym.**, v. 28, p. 3-14, 1995.

BOWLES, J. D. Defense-related proteins in higher plants. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 59, p. 873-907, 1990.

BRADFORD; M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Isolation of nitric oxide synthetase of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1990

BRETT; C., WALDRON; K. **Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls.**, Unwin Hyman, p. 1-3, 114, 1990.

BRISKIN, D. P. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. **Plant. Physiol.**, v. 124, p. 507-514, 2000.

BUCHALA, A. J.; WILKIE, K. C. B. Total hemicelluloses from *Hordeum vulgare* plants at different stages of maturity. **Phytochemistry**, v. 13, p. 1447-1451, 1974.

BUSATO, A. P.; VARGAS-RECHIA, C. G.; REICHER, F. Xyloglucan from the leaves of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**, v. 58, n. 3, p. 525-531, 2001.

BUSATO, A.P.; VARGAS-RECHIA, C.G.; GORIN, P.A.J.; PETKOWICZ, C.L.; TISCHER, C.A.; BOCHICCHIO, R.; REICHER, F. New 4-O-substituted xylosyl units in the xyloglucan from leaves of *Hymenaea courbaril*. **Intern. J. Biol. Macromol.**, v. 35, n. 5, p. 277-282, 2005.

CANIBE, N.; BACH KNUDSEN, K. E. Digestibility of dried and toasted peas in pigs. I. Ileal and faecal digestibility of carbohydrates. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 64, p. 293-310, 1997.

CAPEK, P.; HRIBALOVA, V.; SVANDOVA, E.; SASINKOVA, V.; MASAROVA, J. Characterization of immunomodulatory polysaccharides from *Salvia officinalis* L. **Intern. J. Biol. Macromol.**, v. 33, p. 113-119, 2003.

CARBONERO, E. R.; CORDEIRO, L. M. C.; MELLINGER, C. G.; SASSAKI, G. L.; STOCKER-WÖRGÖTTER, E.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Galactomannans with novel structures from the lichen *Roccella decipiens* Darb. **Carbohydr. Res.**, v. 340, p. 1699-1705, 2005.

CARBONERO, E. R.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. A (1→6) linked β -mannopyranan, pseudonigeran, and a (1→4)-linked β -xylan, isolated from the lichenised basidiomycete *Dictyonema glabratum*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 206, p. 175-178, 2002.

CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; BUCHI, D. F.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; OLIVEIRA, M. B. M. Cytotoxic effects against HeLa cells of polysaccharide from the lichen *Ramalina celastri*. **J. Sub. Cytol. Pathol.**, v. 24, n. 4, p. 1-5, 1997.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant J.**, v. 3, p. 1-30, 1993.

CARPITA, N. C. Fractionation of hemicelluloses from maize cell walls with increasing concentrations of alkali. **Phytochemistry**, v. 23, p. 1089-1093, 1984.

CAVAILLON, J. M. Cytokines and macrophages. **Biomed. Pharmacother.**, v. 48, p. 445-453, 1994.

CHATONET, J. **As Plantas Medicinais**. 1^a. ed. São Paulo: Livraria Martins Fontes, 1983, p. 2-9.

CHAUHAN, J. S; SULTAN, M.; SRIVASTAVA, S. K. Two new glycoflavones from the roots of *Phyllanthus niruri*. **Planta Medica.**, v. 32, p. 217-222, 1977.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; GORIN, P. J.; IACOMINI, M. An arabinogalactan isolated from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 703-706, 2004.

CIUCANU, J.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, v. 131, p. 209-217, 1984.

COHN, Z. A. The activation of mononuclear phagocytes. Fact, fancy and future. **J. Immunol.**, v. 121, p. 813-816, 1978.

COLLINS, P. M.; FERRIER, R. J. **Monosaccharides: their chemistry and their role in natural products**. Chichester: J. Wiley, 1995. 547p.

COOK, M. T.; HAYBALL, P. J.; HUTCHINSON, W.; NOWAK, B.; HAYBALL, J. D. The efficacy of a commercial β -glucan preparation. EcoActivaTM, on stimulating respiratory burst activity of head-kidney macrophages from pink snapper (*Pagrus auratus*), Sparidae. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 11, p. 661-672, 2001

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Robbins: Pathologic basis of disease**. 5 ed., Philadelphia: W. B. Saunders Company, p. 11-13, 1994.

CRAWFORD, R. M.; FINBLOOM, D. S.; CHARA, J.; PAUL, W. E.; MELTZER, M. S. B-cells stimulatory factor-1 (IL-4) activated macrophages for increased tumoricidal activity and expression of Ia antigens. **J. Immunol.**, v. 139, p. 135-141, 1987.

CUNHA, F. Q.; ASSREUY, J.; MONCADA, S.; LIEW, F. Y. Phagocytosis and induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. **Immunol.**, v. 79, p. 408-411, 1993.

DABA, A. S.; EZERONYE, O. U. Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. **African J. Biotechnol.**, v. 2, p. 672-678, 2003.

D'ADAMO P. A simple, inexpensive test to assess neutrophyl activity via a myeloperoxidase-mediated candidicidal index. **J. Naturopath Med.**, v. 1, p. 68-71, 1990.

DELGOBO, C. L.; GORIN, P. A. J.; JONES, C.; IACOMINI, M. Gum heteropolysaccharides and free reducing mono- and oligosaccharides of *Anadenanthera colubrina*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 1207-1214, 1998.

DELGOBO, C. L.; GORIN, P. A. J.; TISCHER, C. A.; IACOMINI, M. The free reducing oligosaccharides of angico branco (*Anadenanthera colubrina*) gum exudate: an aid for structural assignments in the heteropolysaccharides, **Carbohydr. Res.**, v. 99, p. 41-50, 1999.

DERVILLY-PINEL, G.; TRAN, V.; SAULNIER, L. Investigation of the distribution of arabinose residues on the xylan backbone of water-soluble arabinoxylans from wheat flour. **Carbohydr. Polym.**, v. 55, p. 171-177, 2004.

DEVRIES, J. W.; PROSKY, L.; LI, B.; CHO, S. A historical perspective on defining dietary fiber, **Perspective**, v. 44, p. 367-369, 1999.

DIALLO, D.; PAULSEN, B. S.; LILJEBACK, T. H. A.; MICHAELSEN, T. E. The malian medicinal plant *Trichilia emetica*; study on polysaccharides with complement fixing ability. **J. Ethnopharmacol.**, v. 8, p. 279-287, 2003.

DIAS, M. A.; CAMPOS, A. H.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Analysis of the mechanisms underlying the contractile response induced by the hydroalcoholic extract of *Phyllanthus urinaria* in the guinea-pig urinary bladder *in vitro*. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 47, p. 846-851, 1995.

DINAND, E.; VIGNON, M. R. Isolation and characterization of a (4-*O*-methyl-D-glucurono)-D-xylan from sugar beet pulp. **Carbohydr. Res.**, v. 330, p. 285-288, 2001.

DONG, Q.; FANG, J. Structural elucidation of a new arabinogalactan from the leaves of *Nerium indicum*. **Carbohydr. Res.**, v. 332, p. 109-114, 2000.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-356, 1956.

EAGLE, H. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. **Science**, v. 130, p. 432, 1959.

EBINA, T.; FUJIMIYA, Y. Antitumor effect of a peptide-glucan preparation extracted from *Agaricus blazei* in a double-grafted tumor system in mice. **Biotherapy**, v. 11, p. 259-265, 1998.

EBRINGEROVÁ, A.; HROMADKOVÁ, Z.; ALFODI, J.; HRIBALOVÁ, V. The immunologically active xylan from ultrasound-treated corn cobs: extractability, structure and properties. **Carbohydr. Polym.**, v. 37, p. 231-239, 1998.

EDA, S; OHNISHI, A; KATO, K. Xylan isolated from the stalk of *Nicotiana tabacum*. **Agric. Biol. Chem.**, v. 40, p. 359-364, 1976.

EDASHIGE, Y; ISHII, T. Rhamnogalacturonan I from xylem differentiating zones of *Cryptomeria japonica*. **Carbohydr. Res.**, v. 304, p. 357-365, 1997.

EL-MEKKAWY, S.; MESELY, M. R.; KUSUMOTO, I.T.; KADOTA, S.; HATTORI, M.; NAMBA, T. Inhibitory effects of Egyptian folk medicines on human immunodeficiency virus (HIV) reverse transcriptase. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 43, p. 641-648, 1995.

FADOK, V. A.; LASZLO, D. J.; NOBLE, P. W.; WEINSTEIN, L.; RICHES, D. W. H.; HENSON, P. M. Particle digestibility is required for induction of the phosphatidylserine recognition mechanism used by murine macrophages to phagocytose apoptotic cells. **J. Immunol.**, v. 151, p. 4274-4285, 1993.

FENGEL, D.; WEGNER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Gruyter, W. 1989. 613p.

FILHO, V. C.; SANTOS, A. R. S.; CAMPOS, R. P.; MIGUEL, O. G.; YUNES, R. A.; FERRARI, F.; MESSANA, I.; CALIXTO, J. B. Chemical and pharmacological studies of *Phyllanthus caroliniensis* in mice. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 48, p. 1231-1236, 1996.

FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Anal. Biochem.**, v. 197, p. 157-162, 1991.

FINCHER, C. B.; STONE, B. A.; CLARKE, A. E. Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis and function. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, v. 34, p. 47-70, 1983.

FRANCO, L. L. **As Sensacionais 50 Plantas Medicinais Campeãs de Poder Curativo**. São Paulo: Santa Mônica, p. 203-204, 1997.

FRANSEN, C. T. M.; HASELEY, S. R.; HUISMAN, M. M. H.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J.; KAMERLING, J. P.; VLIEGENTHART, J. F. G. Studies on the structure of a lithium-treated soybean pectin: characteristics of the fragments and determination of the carbohydrate substituents of galacturonic acid. **Carbohydr. Res.**, v. 328, p. 539-547, 2000.

FREITAS, A. M.; SCHOR, N.; BOIM, M. A. The effects of *Phyllanthus niruri* on urinary inhibitors of calcium oxalate crystallization and other factors associated with renal stone formation. **B. J. U. Intern.**, v.89, p.829-834, 2002.

FRESHOUR, G.; CLAY, R. P.; FULLER, M. S.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G.; HAHN, M. G. Developmental and tissue-specific structural alterations of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* roots. **Plant Physiol.**, v. 110, p. 1413-1429, 1996.

GABRIELLI, I.; GATENHOLM, P.; GLASSER, W. G.; JAIN, R. K.; KENNE, L. Separation, characterization and hydrogel-formation of hemicellulose from aspen wood. **Carbohydr. Polym.**, v. 43, p. 367-374, 2000.

GHALI, Y.; YOUSSEF, A.; MOBDY, E. Structure of hemicelluloses isolated from *Canavalia ensiformis* and *Triticum aestivum* straws. **Phytochemistry**, v. 13, p. 605-610, 1974.

GLASER, V. Billion-dollar market blossoms as botanicals take root. **Nat. Biotechnol.**, v. 17, p. 17-18, 1999.

GLITSO, L. V.; BRUNSGAARD, G.; HOJSGAARD, S.; SANDSTRÖN, B.; BACH KNUDSEN, K. E. Intestinal degradation in pigs of rye dietary fibre with different structural characteristics. **Brit. J. Nutr.**, v. 80, p. 457-468, 1998.

GOLDMAN, D. Characteristics of the β -glucan receptor of murine macrophages. **Exp. Cell Res.**, v. 174, p. 481-490, 1988.

GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydr. Res.**, v. 128, p. 119-132, 1984.

GREEN, J. S.; CRAWFORD, R. M.; HOCKMEYER, J. T; MELTZER, M. S.; NACY, C. A. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in INF- γ -stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor- γ . **J. Immunol.**, v. 145, p. 4290-4297, 1990.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N nitrates] in biological fluids. **Anal. Biochem.**, v. 126, p. 131-138, 1982.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. **Ann. Epidemiol.**, (in press), 2005.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals reactive species and toxicology. In: Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. (eds.), **Free Radic. Biol. Med.**, p. 544-616, 1999.

HAN, J. Y. Structural characteristics of arabinoxylan in barley, malt, and beer. **Food Chem.**, v. 70, p. 131-138, 2000.

HAN, J. Y.; McDONALD, C. A study of nonstarch carbohydrate in enzyme treated hard red spring wheat gluten. **Food Res. Internat.**, v. 31, p. 511-519, 1999.

HANKS, J. H.; WALLACE, R. E. Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 71, p. 196, 1949.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, v. 48, p. 422-427, 1972.

HASHIMOTO, T.; OHNO, N.; YADOMAE, T. Subgrouping immunomodulating β -glucans by monitoring IFN- γ and NO syntheses. **Drug Develop. Res.**, v. 42, p. 35-40, 1997.

HELDT, H.W. **Plant biochemistry and molecular biology**. New York: Oxford Academic Press., p. 6-8, 1997.

HERRE, J.; GORDON, S.; BROWN, G. D. Dectin-1 and its role in the recognition of β -glucans by macrophages. **Mol. Immunol.**, v. 40, p. 869-876, 2004.

HOEBLER, C.; KARINTHI, A.; DEVAUX, M. F.; GUILLON, F.; GALLANT, D. J. G.; BOUCHET, B.; MELEGARI, C. BARRY, J. L. Physical and chemical transformations of cereal food during oral digestion in human subjects. **Brit. J. Nutr.**, v. 80, p. 429-436, 1998.

HOEBLER, C.; BELLEVILLE, C.; DEVAUX, M. F.; POPINEAU, Y.; BARRY, J. L. Development of an *in vitro* system simulating bucco-gastric digestion to assess the physical and chemical changes of food. **Internat. J. Sci. Nutr.**, v. 53, p. 389-402, 2002.

HOUGH, L.; JONES, J. K. N. Chromatography on paper. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 1, p. 21-31, 1962.

HUCKERBY, T. N.; BROWN, G. M.; NIEDUSZYNSKI, I. A. ^{13}C -NMR spectroscopy of keratan sulphates assignments for four poly (N-acetyllactosamine)-repeat-sequence tetrasaccharides derived from bovine articular cartilage keratan sulphate by keratanase II digestion. **Eur. J. Biochem.**, v. 231, p. 779-783, 1995.

IACOMINI, M.; CASU, B.; GUERRINI, M.; NAGGI, A.; PIROLA, A.; TORRI, G. "Linkage region" sequences of heparins and heparan sulfates: detection and quantification by nuclear resonance spectroscopy. **Anal. Biochem.**, v. 274, p. 50-58, 1999.

IGNÁCIO, S. R. N.; FERREIRA, J. L. P.; ALMEIDA, M. B.; KUBELKA, C. F. Nitric oxide production by murine peritoneal macrophages *in vitro* and *in vivo* treated with *Phyllanthus tenellus* extracts. **J. Ethnopharmacol.**, v. 74, p. 181-187, 2001.

IM, S. A.; OH, S. T.; SONG, S.; KIM, M. R.; KIM, D. S.; WOO, S., S.; JÔ, T. H.; PARK, Y. I.; LEE, C. K. Identification of optimal molecular size of modified *Aloe* polysaccharides with maximum immunomodulatory activity. **Internat. Immunopharmacol.**, v. 5, p. 271-279, 2005.

INGOLFSDOTTIR, K.; JURCIR, K.; FISCHER, B.; WAGNER, H. Immunologically active polysaccharide from *Cetraria islandica*. **Planta Medica**, v. 60, p. 527-531, 1994.

INNGJERDINGEN, K. T.; DEBES, S. C.; INNGJERDINGEN, M.; HOKPUTSA, S.; HARDING, S. E.; ROLSTAD, B.; MICHAELSEN, T. E.; DIALLO, D.; PAULSEN, B. S. Bioactive pectic polysaccharides from *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC., a Malian medicinal plant, isolation and partial characterization. **J. Ethnopharmacol.**, v. 101, p. 204-214, 2005.

ISHII, T. *O*-acetylated oligosaccharides from pectins of potato tuber cell walls. **Plant Physiol.**, v. 113, p. 1265-1272, 1997.

JAMES, S. L; Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiol. Rev.**, v. 59, n. 4, p. 533-547, 1995.

JASSIM, S. A. A.; NAJI, M. A. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. **J. Appl. Microbiol.**, v. 95, p. 412-427, 2003.

JOHANN, S.; ZOLLER, C.; HAAS, S.; BLUMEL, G.; LIPP, M.; FORSTER, R. Sulfated polysaccharide anticoagulants suppress natural killer cell activity in vitro. **Thromb. Haemost.**, v. 74, p. 998-1002, 1995.

JOHANSSON, A.; JESAITIS, A. J.; LUNDQVIST, H.; MAGNUSSON, K. E; SJÖLIN, C.; KARLSSON, A.; DAHLGREN, C. Different subcellular localization of cytochrome b and the dormant NADPH- oxidase in neutrophils and macrophages: effects on the production of reactive oxygen species during phagocytosis. **Cell. Immunol.**, v. 161, p. 61-71, 1995.

JOHNSTON Jr, R. B.; LEHMEYER, J. E. The involvement of oxygen metabolites from phagocytic cells in bactericidal activation and inflammation. In MICHELSON, A. M.; McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. (Ed). **Superoxide and superoxide dismutases**. Academic press, London, 1997, p. 291.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 10 ed., São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1991.

JONES, J. K. N.; STOODLEY, R. J. Fractionation using copper complexes. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 5, p. 36-38, 1965.

JOSELEAU, J. P.; COMTAT, J.; RUEL, K. Chemical structure of xylans and their interaction in the plant cell wall. **Progr. Biotechnol.**, v. 7, p. 1-15, 1992.

JUN, P.Z.; MET, Z.; YUAN, C. Reversal of inhibition of reactive oxygen species on respiratory burst of macrophages by polysaccharide from *Coriolus versicolor*. **Intern. J. Immunopharmacol.**, v. 15, n. 3, p. 429-433, 1993.

KAKURÁKOVÁ, M.; CAPEK, P.; WELLNER, N.; EBRINGEROVÁ, A. FT-IR study of plant cell model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. **Carbohydr. Polym.**, v. 43, p. 195-203, 2000.

KAMINSKI, N. E.; ROBERTS, J. F.; GUTHRIE, F. E. A rapid spectrophotometric method for assessing macrophage phagocytic activity. **Immunol. Letters**, v. 10, p. 329-331, 1985.

KARDOSOVÁ, A.; EBRINGEROVÁ, A.; ALFOLDI, J.; NOSAL'OVA, G.; MATAKOVA, T.; HRIBALOVA, V. Structural features and biological activity of an acidic polysaccharide complex from *Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt. **Carbohydr. Polym.**, v. 57, p. 165-176, 2004.

KARNOVSKI, M. L.; LAZDINS, J. K. Biochemical criteria for activated macrophages. **J. Immunol.**, v. 121, n. 3, p. 809-813, 1978.

KESSLER, R.; DAVIS, R.; FOSTER, D.; VAN ROMPAY, M.; WALTERS, E.; WILKEY, S. Long-term trends in the use of complementary and alternative medicinal therapies in the United States. **Ann. Intern. Med.**, v. 135, p. 262-268, 2001.

KHANNA, A. K.; RIZVI, F.; CHANDER, R. Lipid lowering activity of *Phyllanthus niruri* in hyperlipemic rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 82, p. 19-22, 2002.

KIEMER, A. K.; HARTUNG, T.; HUBER, C.; VOLLMAR, A. M. *Phyllanthus amarus* has anti-inflammatory potential by inhibition of iNOX, COX-2, and cytokines via the NF-κB pathway. **J. Hepatology**, v. 38, p. 289-297, 2003.

KITAYAMA, T.; MORIMOTO, M.; TAKATANI, M.; TAMURA, Y.; TAKUMI, M.; OKAMOTO, T. Isolation of hemicellulose from a sorghum, *Andropogon sorghum* brot, Kumadake no. 263, and determination of its constituent sugars. **Carbohydr. Res.**, v. 325, p. 230-232, 2000.

KLEBANOFF, S. J. Oxygen metabolites from phagocytes In: **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**. Raven Press, p. 541-588, 1992.

KOPP, E. B.; GHOSH, S. NF-(kappa) B and real proteins in innate immunity. **Adv. Immunol.**, v. 58, p. 1-27, 1995.

LEWIS, S.; BURMEISTER, S.; BRAZIER, J. Effect of the prebiotic oligofructose on relapse of *Clostridium difficile*- associated diarrhea: a randomized, controlled study. **Clinical Gastroenterol. Hepatol.**, v. 3, p. 442-448, 2005.

LINDAHL, A.; UNGELL, A. L.; KNUTSON, L.; LENNERNÄS, H. Characterization of fluids from the stomach and proximal jejunum in men and woman. **Pharm. Res.**, v. 14, p. 497-502, 1997.

LOWENSTEIN, C. J.; SNYDER S. H. Nitric oxide, a novel biological messenger. **Cell**, v. 148, p. 705-707, 1992.

McDOUGALL, G. J.; MORRISON, I. M.; STEWART, D.; HILLMAN, J. R. Plant cell wall as dietary fibre: range, structure, processing and function. **J. Sci. Food Agric.**, v. 70, p. 133-150, 1996.

MacMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric oxide macrophage function. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 15, p. 323-350, 1997.

MARCINKIEWICZ, J. Nitric oxide and antimicrobial activity of reactive oxygen intermediates. **Immunopharmacol.**, v. 37, p. 35-41, 1997.

MARLETT, J. A.; FISHER, M. H. The active of psyllium seed husk. **Proceed. Nutr. Soc.**, v. 62, p. 207-209, 2003.

MARTINICHEN-HERRERO, J. C.; CARBONERO, E. R.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Anticoagulant and antithrombotic activities of a chemically sulfated galactoglucomannan obtained from the lichen *Cladonia ibitipocae*. **Intern. J. Biol. Macromol.**, v. 35, p. 97-102, 2005(a).

MARTINICHEN-HERRERO, J. C.; CARBONERO, E. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Anticoagulant and antithrombotic activity of a sulfate obtained from a glucan component of the lichen *Parmotrema mantiqueirense* Hale. **Carbohydr. Polym.**, v. 60, p. 7-13, 2005(b).

McNEIL, M.; DARVILL, A. G.; FRY, S. C. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 53, p. 625-663, 1984.

MELLINGER, C. G. **Caracterização estrutural de polissacarídeos de *Phyllanthus niruri* Linn.** Curitiba, 2002 dissertação (Mestrado em Ciências Bioquímica)- Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

MENESTRINA, J. M.; IACOMINI, M.; JONES, C.; GORIN, P. A. J. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structures in gum exudate of *Anacardium occidentale*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 715-721, 1998.

MIGNÉ, C.; PRENSIER, G.; GRENET, E. Immunogold labelling of xylans and arabinoxylans in the plant cell walls of maize stems. **Biol. Cell**, v. 91, p. 267-276, 1994.

MIGUEL, O. G.; CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. S.; MESSANA, I.; FERRARI, F.; FILHO, V. C.; PIZZOLATTI, M. G.; YUNES, R. A. Chemical and preliminary analgesic evaluation of geraniin and furosin isolated from *Phyllanthus sellowianus*. **Planta Med.**, v. 62, p. 146-149, 1996.

MILLARD, P.; CHESSON, A. Modifications to swede (*Brassica napus* L.) anterior to the terminal ileum of pigs: some implications for the analysis of dietary fibre. **Brit. J. Nutr.**, v. 52, p. 583-594, 1984.

MILLS, E. N. C.; PARKER, M. L.; WELLNER, N.; TOOLE, G.; FEENEY, K.; SHEWRY, P. R. Chemical imaging: the distribution of ions and molecules in developing and mature wheat grain. **J. Cereal Sci.**, v. 41, p. 193-201, 2005.

MIZUNO, M.; MORIMOTO, M.; MINATO, K.; TSUCHIDA, H. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulated lymphocyte T-cell subsets in mice. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 63, p. 434-437, 1998.

MORETÃO, M. P.; BUCHI, D. F.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M. B. M. Effect of an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. **Immunol. Lett.**, v. 89, p. 175-185, 2003.

MORETÃO, M. P.; ZAMPRONIO, A. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M. B. M. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco). **Immunol. Lett.**, v. 93, p. 189-197, 2004.

MOURÃO, P. A. S.; BOISSON-VIDAL, C.; TAPON-BRETAUDIÈRE, J.; DROUET, B.; BROS, A.; FISCHER, A. M. Inactivation of thrombin by a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. **Thrombosis Res.**, v. 102, p. 167-176, 2001.

MUNÕZ, V.; SAUVAIN, M.; BOURDY, G.; CALLAPA, J.; ROJAS, I.; VARGAS, L.; TAE, A.; DEHARO, E. The search for natural bioactive compounds through a

multidisciplinary approach in Bolivia. Part II. Antimalarial activity of some plants used by Mosetene Indians. **J. Ethnopharmacol.**, v. 69, n. 2, p. 139-155, 2000.

NANDINI, C. D.; SALIMATH, P. V. Carbohydrate composition of wheat, wheat bran, sorghum and bajra with good chapati/roti (Indian flat bread) making quality. **Food Chem.**, v. 73, p. 197-203, 2001.

NATHAN, C. F. Regulation of macrophages oxidative metabolism and antiparasitic activity. In: van FURTH, R. **Mononuclear Phagocytes Characteristics, Physiology and Function**. Boston: Martinus Nijhoff, p. 411-420, 1985.

NAVARINI, L.; GILLI, R.; GOMBAC, V.; ABATANGELO, A.; BOSCO, M.; TOFFANIN, R. Polysaccharides from hot water extracts of roasted *Coffea arabica* beans: isolation and characterization. **Carbohydr. Polym.**, v. 40, p. 71-81, 1999.

NERGARD, C. S.; MATSUMOTO, T.; INNGJEERDINGEN, M.; INNGJEERDINGEN, K.; HOKPUTSA, S.; HARDING, S. E.; MICHAELSEN, T. E.; DIALLO, D.; KIYOHARA, H.; PAULSEN, B. S.; YAMADA, H. Structural and immunological studies of a pectin and a pectic arabinogalactan from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. Ex walp. (Asteraceae) **Carbohydr. Res.**, v. 340, p. 115-130, 2005.

NEWBURG, D. S.; RUIZ-PALACIOS, G. M.; MORROW, A. L. Human milk glycans protect infant against enteric pathogens. **Ann. Rev. Nutr.**, v. 25, p. 37-58, 2005.

NIKLAS, K. Cell wall formation. Disponível em <http://www.accessexcellence/BF/bf04/niklas/slides/slideWin7.htm>. Acessado em Setembro, 2001.

NOLETO, G. R.; MERCÊ, A. L. R.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; OLIVEIRA, M. B. M. Yeast mannan-vanadium (IV) complexes and their effects on peritoneal macrophages. **Carbohydr. Polym.**, v. 57, p. 113-122, 2004.

NOLETO, G. R.; MERCÊ, A. L. R.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; THOMAZ-SOCCOL, V.; OLIVEIRA, M. B. M. Effects of a lichen galactomannan and its vanadyl (IV) complex on peritoneal macrophages and leishmanicidal activity. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 233, p. 73-83, 2002.

NOSAL`OVA, G.; KARDOSOVÁ, A.; FRANOVA, S. Antitussive activity of a glucuronoxylan from *Rudbeckia fulgida* compared to the potency of two polysaccharide complexes from the same herb. **Pharmazie**, v. 55, p. 65-68, 2000.

NOTKA, F.; MEIER, G. R.; WAGNER, R. Inhibition of wild-type human immunodeficiency virus and reverse transcriptase inhibitor-resistant by *Phyllanthus amarus*. **Antiviral Res.**, v. 58, p. 175-186, 2003.

NUSSLER, A. J.; BILLIAR, T. R. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. **J. Leukocytes Biol.**, v. 54, p. 171-178, 1993.

OGATA, T.; HIGUSHI, H.; MOCHIDA, S.; MATSUMOTO, H.; KATO, A.; ENDO, T.; KAJI, A.; KAJI, H. HIV-1 reverse transcriptase inhibitor from *Phyllanthus niruri*. **AIDS. Res. Hum. Retroviroses**, v. 8, p. 1937-1944, 1992.

OKASAKI, M.; ADACHI, Y.; OHNO, N.; YODAMAE, T. Structure-activity relationship of (1→3)-D-β-glucans in the induction of cytokine production from macrophages, *in vitro*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 18, p. 1320-1327, 1995.

OKASAKI, M.; CHIBA, N.; ADACHI, Y.; OHNO, N.; YODAMAE, T. Signal transduction pathway on β-glucans triggered hydrogen peroxide production by murine macrophages *in vitro*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 19, n. 1, p. 18-23, 1996.

O'NEILL, M.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. The pectic polysaccharides of primary cell walls. In: DEY, D. M. **Methods in Plant Biochemistry**. London: Academic Press, 1990, p. 415-441.

OOI, V. E.; LIU, F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. **Curr. Med. Chem.**, v. 7, p. 715-729, 2000.

PARK, J. W.; BABIOR, B. M. The translocation of respiratory burst oxidize components from cytosol to plasma membrane is regulated by guanine nucleotides and diacylglycerol. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 19901-19906, 1992.

PARK, J. W.; MA, M.; RUEDI, J. M.; SMITH, R. M.; BABIOR, B. M. The cytosolic components of the respiratory burts oxidase exists as a Mr ~240.000 complex that acquires a membrane binding site during activation of oxidize in cell-free system. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 17327-17332, 1992.

PENG, Y.; ZHANG, L.; ZENG, F.; KENNEDY, J. F. Structure and antitumor activities of the water-soluble polysaccharides from *Ganoderma tsugae* mycelium. **Carbohydr. Polym.**, v. 59, p. 385-392, 2005.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. **Anal. Biochem.**, v. 83, p. 346-356, 1977.

PETTIT, G. R.; SCHAUFELBERGER, D. E. Isolation and structure of the cytostatic lignan glycoside phyllanthostatin A. **J. Nat. Prod.**, v. 51, p. 1104-1112, 1988.

PETTIT, G. R.; SCHAUFELBERGER, D. E.; NIEMAN, R. A.; DUFRESNE, C.; SAENZ-RENAULD, J. A. Antineoplastic agents, 177. Isolation and structure of phyllanthostatin 6. **J. Nat. Prod.**, v. 53, p. 1406-1413, 1990.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **J. Immunol. Methods**, v. 38, p. 161-170, 1980.

PIERARD, G. E.; ESTRADA, J. A.; FRANCHIMONT, C. P.; THIRY, A.; STYNEN, D. Immunohistochemical expression of galactomannan in the cytoplasm of phagocytic cells during invasive aspergillosis. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 96, p. 373-376, 1991.

POPOV, S. V.; POPOVA, G. Y.; OVODOVA, R. G.; BUSHNEVA, O. A.; OVODOV, Y. S. Effects of polysaccharide from *Silene vulgaris* on phagocytes. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 21, p. 617-624, 1999.

POWIS, G.; MOORE, D. J. High-performance liquid chromatographic assay for the antitumor glycoside phyllanthoside and its stability in plasma of several species. **J. Chromatogr.**, v. 342, p. 129-134, 1985.

PRESCOTT, J. H.; ENRIQUEZ, P.; JUNG, C.; MENZ, E.; GROMAN, E. Larch arabinogalactan for hepatic drug delivery: isolation and characterization of a 9 kDa arabinogalactan fragment. **Carbohydr Res.**, v. 278, p. 113-28, 1995.

PULS, J.; SCHUSEIL, J. Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. In: **Hemicellulose and hemicellulases.**, London: Portland Press Research Monograph, 1993, p. 1-27.

QUIAN-CUTRONE, J.; HUANG, S.; TRIMBLE, J.; LI, H.; LIN, P.F.; ALAM, M.; KLOHR, S.E.; KADOW, K.F. Niruriside, a new HIV REV/RRE binding inhibitor from *Phyllanthus niruri*. **J. Nat. Prod.**, v. 59, p. 196-199, 1996.

RAJESHKUMAR, N. V.; KUTTAN, R. *Phyllanthus amarus* extract administration increases the life span of rats with hepatocellular carcinoma. **J. Ethnopharmacol.**, v. 73, p. 215-219, 2000.

RAMESH, H. P.; YAMAKI, K.; TSUSHIDA, T. Effects of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) galactomannan fractions on phagocytosis in rat macrophages and on proliferation and IgM secretion in HB4C5 cells. **Carbohydr. Polym.**, v. 50, p. 79-83, 2002.

RAPHAEL, K. R.; SABU, M. C.; KUTTAN, R. Hypoglycemic effect of methanol extract of *Phyllanthus amarus* Shum & Thonn on alloxan induced diabetes mellitus in rats and relation with antioxidant potential. **Ind. J. Exp. Biol.**, v. 40, p. 905-909, 2002.

RAVEN, P.; EVERT, R.F.; EICHORN, S.E. **Biology of Plants**, 6 ed., New York: W.H. Freeman, 1999.

REICHER, F.; CORRÊA, J. B. C. Lignin-hemicellulose complexes from the stem of *Mimosa bracingia*, Hoehne. Na. **Acad. Bras. Ciênc.**, v. 54, p. 579-584, 1982.

REICHER, F.; CORRÊA, J. B. C.; GORIN, P. A. J. Location of *O*-acetyl groups in the acidic D-xylan of *Mimosa scabrella*. A study of *O*-acetyl group migration. **Carbohydr. Res.**, v. 135, p. 129-140, 1984.

REICHER, F.; GANTER, J. L. M. S.; RECHIA, C. V. G.; SIERAKOWSKI, M. R.; GORIN, P. A. J. Uneven *O*-acetyl distribution in a lightly acetylated D-xylan from sugar cane. **Ciência & Cultura**, v. 46, p. 283-285, 1994.

REICHER, F.; GORIN, P. A. J.; SIERAKOWSKI, M. R.; CORRÊA, J. B. C. Highly uneven distribution of *O*-acetyl groups in the acidic D-xylan of *Mimosa scabrella* (Bracingia). **Carbohydr. Res.**, v. 193, p. 23-31, 1989.

REID, J. S. G. **Plant Biochemistry**. New York: Academic Press., p. 205-212, 1997.

REILLY, T. P.; BELLEVUE, F. H.; WORSTER, P. M.; SVENSSON, C. K. Comparison of the *in vitro* cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochem. Pharmacol.**, v. 55, p. 803-810, 1998.

RIDLEY, B. L.; O'NELLY, M. A.; MOHNEN, D. Pectins:structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v. 57, p. 929-967, 2001.

ROITT, I.; RABSON, A. **Imunologia básica**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2003.

ROSENBERG, S. A. Principles and applications of biologic therapy. In: DE VITA, V. T.; HELLMANN, S.; ROSENBERG, S. A. (eds) **Cancer: Principles & Practice of Oncology**. 4 ed. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1993, p. 276-292.

ROTROSEN, D. **The Respiratory Burst Oxidase in Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**. Raven Press, 1992, p. 589-601.

SAIMA, Y.; DAS, A. K.; SARKAR, K. K.; SEM, A. K.; SUR, P. An antitumor pectic polysaccharide from *Feronia limonia*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 27, p. 333-335, 2000.

SAMUELSEN, A. B.; PAULSEN, B. S.; WOLD, J. K.; KNULSEN, S. H.; YAMADA, H. Characterization of a biologically active arabinogalactan from the leaves of *Plantago major* L., **Carbohydr. Polym.**, v. 35, p. 45-153, 1998.

SANTOS, A. R. S.; DE CAMPOS, R. O. P.; MIGUEL, O. G.; FILHO, V. C.; SIANI, A. C.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive properties of extracts of new species of plants of the genus *Phyllanthus*. **J. Nat. Prod.**, v. 72, p. 229-238, 2000.

SANTOS, A. R. S.; NIERO, R.; FILHO, V. C.; YUNES, R. A.; PIZZOLATTI, M. G.; MONACHE, F. D.; CALIXTO, J. B. Antinonceptive properties of steroids isolated from *Phyllanthus corcovadensis* in mice. **Planta Med.**, v. 61, p. 329-332, 1995.

SANTOS, C. A. M.; TORRES, K. R.; LEONART, R. **Plantas Medicinais (herbarium, flora et scientia)**. São Paulo: Cone, p. 11, 135, 1987.

SANZ, M. L.; COTE, G. L.; GIBSON, G. R.; RASTALL, R. A. Prebiotic properties of alternansucrose maltose-acceptor oligosaccharides. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 5911-5916, 2005.

SASADA, M.; PABT, M. J.; JOHNSTON Jr., R. B. Activation of peritoneal macrophages by lipopolysaccharides alters the kinetic parameters of the superoxide-producing NADPH oxidase. **J. Biol. Chem.**, v. 258, p. 9631-9635, 1983.

SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, L. M.; CZELUSNIAK, P. A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially *O*-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydr. Res.**, v. 340, p. 731-739, 2005.

SCHINDLER, T.M. **The view of primary cell wall**. Z. Pflanzenernähr. Bodenk., v. 161, p. 499-508, 1998.

SAEMAN, J. F.; MOORE, W. E.; MITCHELL, R. L.; MILLET, M. A. Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. **Tech. Assoc. Pulp Pap. Ind.**, v. 37, p. 336-343, 1954.

SCHEPETKIN, I. A.; QUINN, M. T. Botanical Polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **Intern. Immunopharmacol.**, v. 6, p. p. 317-333, 2006.

SHU, C. H.; LIN, K. J.; WEN, B. J. Effects of culture pH on the production of bioactive polysaccharides by *Agaricus blazei* in batch cultures. **J. Chem. Tech. & Biotech.**, v. 79, n. 9, p. 998-1002, 2004.

SIMAS, F. F.; GORIN, P. A. J.; GUERRINI, M.; NAGGI, A.; SASSAKI, G. L.; DELGOBO, C. L.; IACOMINI, M. Structure of a heteroxylan of gum exudates of the palm *Scheelea phalerata* (uricuri). **Phytochemistry**, v. 65, p. 2347-2355, 2004.

SJÖSTRÖN, E. **Wood Chemistry Fundamentals and Applications**. 2 ed. San Diego: Academic Press, 1993.

SKIPSKI, V. P. Thin layer chromatography of neutral glycolipids. **Methods Enzymol.**, San Diego, v. 35, p. 396-425, 1985.

SLIVA, D.; SEDLAK, M.; SLIVOVA, V.; VALACHOVICOVA, T.; LLOYD JR., F. P.; HO, N. W. Y. Biologic activity of spores and dried powder from *Ganoderma lucidum* for the inhibition of highly invasive human breast and prostate cancer cells. **J. Altern. and Complem. Med.**, v. 9, p. 491-497, 2003.

SMITH, C. J. Carbohydrate chemistry. In: LEA, P. J.; LEEGOOD, R. C. **Plant biochemistry and molecular biology**. England: John Wiley & Sons, 1993, p. 106-108.

SONG, J. Y.; HAN, S.K.; SON, E. H.; PYO, S. N.; YUN, Y. S.; YI, S.Y. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages by ginsan. **Int. Immunopharmacol.**, v. 2, p. 857-865, 2002.

SRIVIDYA, N., PERIWAL, S. Diuretic, hypotensive and hypoglycaemic effect of *Phyllanthus amarus*. **Ind. J. Exp. Biol.**, v. 33, p. 861-864, 1995.

STEPHEN, A. M. Other plant polysaccharides. In: **The Polysaccharides**, v. 2, New York: Academic Press, p. 98-180, 1983.

STONE, B. A.; CLARKE, A. E. **Chemistry and biology of (1→3)-β-glucans**. Victoria, Australia: La Trobe University Press, p. 60-75, 283-358, 1992.

STUELP-CAMPELO, P. M.; OLIVEIRA, M. B. M.; LEÃO, A. A. C.; CARBONERO, E. R. GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Effect of a soluble α-D-glucan from the lichenized fungus *Ramalina celastri* on macrophage activity. **Int. Immunopharmacol.**, v. 2, p. 691-698, 2002.

SUN, R. C.; FANG, J. M.; TOMKINSON, J.; GENE, Z. C.; LIU, J. C. Tractional isolation, physico-chemical characterization and homogeneous esterification of hemicelluloses from fast-growing poplar wood. **Carbohydr. Polym.**, v. 44, p. 29-39, 2001.

TALARICO, L. B.; ZIBETTI, R. G. M.; FARIA, P. C. S.; SCOLARO, L. A.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. **Intern. J. Biol. Macromol.**, v. 34, p. 63-71, 2004.

TAYLOR, L. Tropical plant database. Database file for chanca piedra (*Phyllanthus niruri*, *amarus*). Disponível em [http:// www.rain-tree.com/chanca.htm](http://www.rain-tree.com/chanca.htm). Acessado em Setembro, 2001.

TAYLOR, R. L.; CONRAD, H. E. Steichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. **Biochemistry**, v. 11, p. 1383-1388, 1972.

TIMELL, T. E. Wood hemicelluloses Part I. **Adv. Carbohydr. Chem.**, v. 19, p. 247-302, 1964.

TISCHER, C. A.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. The free reducing oligosaccharides of gun Arabic: aids for structural assignments in the polysaccharide. **Carbohydr. Polym.**, v. 47, p. 151-158, 2002.

TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D. P.; HARRISON, J. S. Detection of sugars on paper chromatograms. **Nature**, v. 166, p. 444, 1950.

UENO, H.; HORIE, S.; NISHI, Y.; SHOGAWA, H.; KAWASAKI, M.; SUSUKI, S.; HAYASHI, T.; ARISAWA, M.; SHIMIZU, M.; YOSHIZAKI, M.; MORITA, N. Chemical and pharmaceutical studies on medicinal plants in Paraguay. Geraniin, an angiotensin-converting enzyme inhibitor from "Paraparai Mi", *Phyllanthus niruri*. **J. Nat. Prod.**, v. 51, p. 357-359, 1988.

UNIVERSITY OF MARYLAND – MEDICAL CENTER. Digestive Disorders. Disponível em <http://www.umm.edu/digest/howworks.htm>. Acessado em Dezembro, 2004.

VADIVELLOO, P. K.; VAIRO, G. HERTZOG, P.; KOLA, I.; HAMILTON, J. A. Role of type I interferons during macrophage activation by lipopolysaccharide. **Cytokine**, v. 12, p. 1639-1646, 2000.

Van der VEEN, R. C.; DIETLIN, T. A.; GRAY, J. D.; GILMORE, W. Macrophage derived nitric oxide inhibits the proliferation of activated T Helper cells and induced during antigenic stimulation of resting T cells. **Cell Immunol.**, v. 199, p. 43-49, 2000.

VENKATESWARAN, P. S.; MILLMAN, I.; BLUMBERG, B.S. Effects on an extract from *Phyllanthus niruri* on hepatitis B and woodchuck hepatitis viruses. *in vitro* and *in vivo* studies. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 84, p. 274-278, 1987.

WAGNER, H.; JORDAN, E. An immunologically active arabinogalactan from *Viscum album* berries. **Phytochemistry**, v. 27, p. 2511-2517, 1998.

WAKSHULL, E.; BRUNKE-REESE, D.; LIDERMUTH, J.; FISETTE, L.; NATHANS, R. S.; CROWLEY, J. J. TUFTS, J. C. ZIMMERMAN, J.; MACKIN, W.; ADAMS, D. S. PGG-glucan, a soluble β -(1,3)-glucan enhances the oxidative burst response, microbicidal activity, and activates an NK-kappa B-like factor in human PMN: evidence for a glycosphingolipid β -(1,3)-glucan receptor. **Immunopharmacol.**, v. 41, p. 89-107, 1999.

WANG, Q.; WOOD, P. J.; CUI, W.; ROSS-MURPHY, B. The effect of autoclaving on the dispersibility and stability of three neutral polysaccharides in dilute aqueous solutions. **Carbohydr. Polym.**, v. 45, p. 355-362, 2001.

WHISTLER, R. L. **The Carbohydrates: Chemistry and Biochemistry**. London: Academic Press., p. 447-458, 1970.

WHISTLER, R. L.; BE MILLER, J. N. **Industrial Gums-Polysaccharides and their Derivatives**. New York: Academic Press, p. 271-515, 1959.

WILLIAMS, J. D.; TOPLEY, N.; ALOBAIDI, H. M.; HARBER, M. J. Activation of human polymorphonuclear leukocytes by particulate zymosan is related to both its major carbohydrate components: glucan and mannan. **Immunol.**, v. 58, p. 117-125, 1986.

WING, E. D.; REMINGTON, J. S. In: **Basic and Clinical Immunology**. Los Altos, Lange, 1980, p. 129-143.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 2, p. 65-68, 1963a.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 2, p. 211-215, 1963b.

YAMAGUCHI, T.; KANEDA, M. Presence of cytochrome b-558 in guinea-pig alveolar macrophages-sub-cellular localization and relationship with NADPH oxidase. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 933, p. 450-459, 1988.

YORK, W. S.; DARVILL, A. G.; McNEIL, M.; STEVENSON, T. T.; ALBERSHEIM, P. Cell wall. I. Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall components. **Methods Enzymol.**, v. 118, p. 3-40, 1985.

YUI, T.; IMADA, K.; SHIBUYA, N.; OGAWA, K. Conformation of an arabinoxylan isolated from the rice endosperm cell wall by X-ray diffraction and a conformational analysis. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 59, p. 965-968, 1995.

ZHANG, P.; ZHANG, Q.; WHISTLER, R. L. L-Arabinose release from arabinoxylan and arabinogalactan under potential gastric acidities. **Cereal Chem.**, v. 80, p. 252-254, 2003.

ZHUANG, J. C.; WOGAN, G. N. Growth and viability of macrophages continuously stimulated to produce nitric oxide. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 94, p. 11875-11880, 1997.

